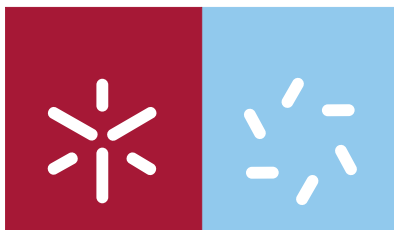


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Rose Marie Oliveira Ferreira de Sousa

FRAGRÂNCIAS VEGETAIS COM ACTIVIDADE ANTI-INSECTO
Óleos Essenciais de *Lavandula angustifolia* P. Mill., *Foeniculum vulgare* Mill., *Petroselinum crispum* (Mil.) A.W. Hill e *Anethum graveolens* L. e suas actividades contra *Anopheles atroparvus* van Thiel, 1927 (Diptera, Culicidae)



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Rose Marie Oliveira Ferreira de Sousa

FRAGRÂNCIAS VEGETAIS COM ACTIVIDADE ANTI-INSECTO

**Óleos Essenciais de *Lavandula angustifolia*
P. Mill., *Foeniculum vulgare* Mill.,
Petroselinum crispum (Mil.) A.W. Hill e
Anethum graveolens L. e suas actividades
contra *Anopheles atroparvus* van Thiel,
1927 (Diptera, Culicidae)**

Tese de Mestrado

Mestrado em Biotecnologia e Bio-empendedorismo
em Plantas Aromáticas e Medicinais

Trabalho efectuado sob a orientação do
Professor Doutor Manuel Fernandes-Ferreira

Este trabalho foi realizado nas instalações do Centro de Investigação e de Tecnologias Agro-Ambientais e Biológicas (CITAB), Departamento de Biologia da Escola de Ciências da Universidade do Minho e nas instalações da Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médica (UPMM), Unidade de Entomologia Médica do Instituto de Higiene e Medicinal Tropical da Universidade Nova de Lisboa

Dezembro de 2009

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A
REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE

Universidade do Minho, ____/____/____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de apresentar os meus sinceros agradecimentos ao meu orientador, o Professor Doutor Manuel Fernandes Ferreira. É com imensa gratidão que reconheço a disponibilidade que tem tido comigo desde a realização do estágio curricular da licenciatura de Biologia Aplicada até à conclusão deste mestrado. Quero agradecer-lhe a paciência, compreensão e atenção que me tem dedicado e por me acompanhar ao longo da minha formação científica. Muito obrigada pelos seus conselhos e pelos desafios que me tem colocado.

Agradeço igualmente ao Professor Doutor António José dos Santos Grácio pela oportunidade que me foi concedida ao desenvolver parte deste trabalho na Unidade de Entomologia Médica, no Instituto de Higiene e Medicina Tropical (UEM/IHMT) da Universidade Nova de Lisboa. Esta foi sem dúvida uma experiência muito especial e enriquecedora.

Pela mesma ocasião, quero agradecer às pessoas que encontrei no UEM/IHMT: a Diara Kady Rocha e a Carla Maria Carrêlo Mendes. Obrigada pelo forma como me receberam e pelos momentos inesquecíveis de cumplicidades e partilha. Um agradecimento especial para a Mestre Diara Rocha pela sua competência, honestidade e ajuda na realização e revisão do trabalho levado a cabo no instituto.

À Engenheira Graça Soares e sua empresa *Ervas Finas*, agradecemos toda a colaboração e material vegetal que gentilmente nos facultou para este trabalho. Obrigada pela inspiração e tranquilidade que nos transmite na sua quinta.

Ao Doutor Franklin Gregory do laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Biologia, Universidade do Minho, agradeço a sua contribuição neste trabalho, por me ter orientado na metodologia de transformação e indução de *hairy roots*. Para além disso, é com muita gratidão que reconheço a sua ajuda e sua presença valiosa como companheiro de laboratório.

Deixo igualmente uma palavra de agradecimento e de reconhecimento aos docentes que contribuíram para a criação do Mestrado em Biotecnologia e Bio-empendedorismo de Plantas Aromáticas e Medicinais. Obrigada pela vossa motivação, sabedoria, acessibilidade e pela transmissão de conhecimentos.

Quero manifestar o meu reconhecimento à Universidade do Minho e aos professores do departamento de Biologia que contribuíram para a resolução dos problemas na consequência do incêndio ocorrido na sala das culturas vegetais. Um agradecimento muito especial à Professora Doutora Ana Cristina Gomes Cunha, digna de louvores pelo seu esforço incansável, que ao longo de mais de quatro meses fez tudo o que estava ao seu alcance para resolver as questões técnicas e burocráticas inerentes à remodelação da sala de culturas vegetais. Muito Obrigada pela sua persistência.

Obrigada, a todos os técnicos do departamento de Biologia, sem os quais não seria possível executar este trabalho. A competência com que desempenharam as suas funções foi um contributo essencial para resolver algumas limitações e agilizar alguns processos. A vossa disponibilidade ajuda, paciência e amabilidade em todas as situações é digna de agradecimentos. Obrigada à Magda Maria Couto Silva Graça e à Cristina Maria Carvalho Mata Ribeiro pela inigualável simpatia.

Gostaria de agradecer a todas as pessoas do Departamento de Biologia com as quais tenho convivido e em especial aos meus colegas dos Laboratórios de Biologia Vegetal I e II que estiveram presentes no meu dia-a-dia durante este período de trabalho. Quero agradecer a vossa colaboração, companhia, boa disposição e simpatia.

Finalmente quero manifestar a enorme gratidão que nutro por muitas pessoas. As palavras de agradecimentos não representam nada diante da sua importância:

Aos meus amigos, que continuam presentes para além das diferenças, das vicissitudes da vida e da distância.

Aos meus pais, a quem devo tudo, e aos meus irmãos, que foram crescendo sem a irmã mais velha, deixo aqui uns agradecimentos muito sentidos. Obrigada por continuarem a vossa luta de todos os dias apesar da saudade e por me apoiarem ao longo do meu caminho, apesar do afastamento. Devo dizer, sem embaraços, que o meu sucesso e bem-estar, presente e futuro, se devem essencialmente ao amor e sacrifício dos meus pais e irmão, por isso, a vós dedico este trabalho.

Ao Sérgio, de quem tenho recebido muito mais do que se pode esperar de um companheiro de vida, muito obrigada pela tua paciência e pelo apoio, em particular neste último ano. A tua presença foi fundamental para a conclusão deste trabalho. Obrigada por me trazeres à razão quando os desafios ou tarefas me deixaram assoberbada e entorpecida.

FRAGRÂNCIAS VEGETAIS COM ACTIVIDADE ANTI-INSECTO

Óleos Essenciais de *Lavandula angustifolia* P. Mill., *Foeniculum vulgare* Mill., *Petroselinum crispum* Mill. e *Anethum graveolens* L. e suas actividades contra *Anopheles atroparvus* van Thiel, 1927

Resumo

A actividade insecticida ou insecto-repelente de óleos essenciais (OEs) de plantas aromáticas e seus constituintes (compostos terpenóides e fenilpropanóides) são largamente reconhecidas. (Regnault-Roger, 1997). Este potencial anti-insecto deve-se essencialmente à relativa simplicidade química dos constituintes voláteis e especificidade dos seus modos de acção ao nível de alguns receptores dos insectos (Isman e Akhtar, 2007; Shaaya e Rafaeli, 2007). As espécies das famílias Lamiaceae e Apiaceae são fontes de compostos com potencial actividade insecto-tóxica. Assim, procurou-se caracterizar os OEs extraídos de diferentes partes de plantas *in vivo* e plântulas *in vitro* de *Lavandula angustifolia* (alfazema), *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* (funcho amargo), *Petroselinum crispum* spp. *neapolitanum* (salsa de folha lisa) e *Anethum graveolens* (aneto). Paralelamente, foi planeada a avaliação da actividade anti-insecto dos OEs contra o mosquito *Anopheles atroparvus* (Diptera, Culicidae), um importante vector da Malária na Europa, especialmente em Portugal.

A primeira fase da investigação consistiu no isolamento (hidrodestilação) dos OEs de plantas *in vivo* de: alfazema (espigas florais), funcho amargo e salsa (infrutescências e partes vegetativas) e aneto (partes vegetativas); e sua posterior análise em GC e GC-MS. Os dados quantitativos foram obtidos recorrendo ao GC-FID enquanto a identificação dos constituintes foi efectuada com base na análise dos espectros de massa (consulta das bases de dados) e na determinação dos KI. No conjunto das amostras, 88 a 99,5% dos constituintes foram identificados. O funcho e a alfazema permitiram uma recolha de maiores volumes de OE (3-5% e 4% v/p, respectivamente) relativamente à salsa (0,25-1,2% v/p). As flores de alfazema caracterizaram-se pelo seu elevado teor percentual em linalool (55%), cânfora (11%) e terpinen-4-ol (8%), enquanto os respectivos rebentos caulinares, cultivados *in vitro* (meio MS com 0,5 mg/l BA), distinguiram-se pelo seu conteúdo em 1,8-cineole (23%), cânfora (15%) e borneol (11%). As infrutescências de funcho apresentaram estragole (53%), fenchona (17%) e *trans*-anetole (14%) como principais compostos e as partes vegetativas foram caracterizados pelo seu teor em estragole (58%), α -felandreno (12%), fenchona (8%) e β -felandreno (7%). As infrutescências de salsa eram ricas em aliltetrametoxibenzeno (34%), apiole (14%), 1,3,8-*p*-mentatrieno (13%), α e β -pineno (13% e 12%). As folhas apresentaram teores elevados de 1,3,8-*p*-mentatrieno (48%) e terpinoleno mais 2,5- dimetil estireno (12%). Por fim, uma amostra de OE de caules e folhas de Aneto foi igualmente estudada. O α -felandreno (67%), o dill éter (15%) e o β -felandreno (11%) foram os compostos encontrados em maior abundância. Por seu lado, Os perfis dos OEs de plântulas de funcho, salsa e aneto germinadas e cultivadas *in vitro* (segunda componente do trabalho), foram substancialmente diferentes dos perfis das respectivas plantas *in vivo*. Elevados teores de miristicina (35%), apiole (11%) e dill apiole (10%) (fenilpropanóides) foram detectados em plântulas de aneto.

Numa segunda fase, a actividade larvicida dos OEs de alfazema, funcho e salsa foi avaliada através da realização de ensaios de sensibilidade em larvas de *An. atroparvus*, no IHMT (Lisboa). As emulsões de OE em água foram testadas numa gama de concentrações optimizadas. O tratamento

estatístico (análise Log-Probit) e a determinação dos parâmetros de letalidade (CL50 e CL90) após 24 e 48h de exposição, foi realizado com a aplicação do software SPSS 16.0. O OE de Alfazema foi considerado muito pouco eficiente enquanto ambos os OEs de funcho exibiram um efeito letal satisfatório. O OE de partes vegetativas mostrou-se eficiente para causar 50% de morte (CL50=50 ppm e CL50=39 ppm, para 24 e 48h, respectivamente). Por seu lado, as concentrações letais determinadas para o OE de infrutescências para induzir 90% de morte foram menores relativamente ao OE de caules e folhas (CL90=107 ppm e CL90=129 ppm às 24h, respectivamente). A actividade larvívora dos OEs de funcho deverá estar relacionada com o seu teor em *trans*-anetole. Porém, os resultados evidenciados para as partes vegetativas indicam que outros compostos presentes nos OEs (estragole e fenchona, etc.) poderão ser igualmente activos. Relativamente ao OE de infrutescências de salsa, este exibiu uma toxicidade aguda.

PLANTS FRAGRANCES WITH ANTI-INSECT ACTIVITY

Essential Oils of *Lavandula angustifolia* P. Mill., *Foeniculum vulgare* Mill., *Petroselinum crispum* Mill. e *Anethum graveolens* L. and their activity against *Anopheles atroparvus* van Thiel, 1927

Abstract

The toxic and repellent activities of aromatic plant essential oils (EOs) (terpenoids and phenylpropanoids compounds) against insects have long time been recognized (Regnault-Roger, 1997). Their potential anti-insect activity is essentially due to their relative chemical simplicity and specific mode-of-action against some insect receptors (Isman and Akhtar, 2007; Shaaya and Rafaeli, 2007). Several species of the Lamiaceae and Apiaceae family are sources of potential insect toxic compounds. This work had as objectives the characterization of the EOs from different parts of *in vivo* plants and respective *in vitro* plantlets of *Lavandula angustifolia* (lavender), *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* (wild fennel), *Petroselinum crispum* spp. *neapolitanum* (plain leaf parsley), *Anethum graveolens* (dill) and the evaluation of their anti-insect activity against the *Anopheles atroparvus* (Diptera, Culicidae) mosquito, one of the most important Malaria vector in Europe, especially Portugal.

The first part of investigation consisted in the isolation of EOs (hydrodistillation) from *in vivo* lavender (flowers spikes), fennel (infrutescences and vegetative parts), parsley (infrutescences and vegetative parts) and dill (vegetative parts) and their analysis by GC and GC-MS. Quantitative data were obtained using GC-FID and identification of constituents was achieved with help of spectra libraries and determination of their KI. Among all samples, 88 to 99.5% of constituents were identified. Fennel and lavender were found to be much more productive (3-5% and 4% v/p, respectively) than parsley (0.25-1.2% v/p) which respect to EO content. Lavender flowers were characterized by high contents of linalool (55%), camphor (11%) and terpinen-4-ol (8%) and the EO from lavender shoots cultured *in vitro* (MS medium and 0.5 mg/l of BA) was especially rich in 1,8-cineole (23%), camphor (15%) and borneol (11%). Fennel EO from infrutescences had estragole (53%), fenchone (17%) and *trans*-anethole (14%) as main compounds, while the EO from Fennel vegetative parts was mainly constituted by estragole (58%), α -phellandrene (12%), fenchone (8%) and β -phellandrene (7%). Parsley infrutescences presented allyltetramethoxybenzene (34%) as the main constituent of the EO, followed by apiole (14%), 1,3,8-*p*-menthatriene (13%), α - and β -pinene (13% and 12%). Leaves and stems of Parsley showed a higher content of 1,3,8-*p*-menthatriene (48%) and terpinolene plus 2,5- dimethylstyrene (12%). A sample of dill EO from stems and leaves was also studied. α -Phellandrene (67%), dill ether (15%) and β -phellandrene (11%) were the most abundant compounds. On the other hand, the EO profiles of fennel, parsley and dill plantlets germinated and cultivated *in vitro* (second phase of the work) were substantially different from the original *in vivo* plants profiles. Dill plantlets were extremely rich in myristicin (35%), apiole (11%) and dill-apiole (10%) (phenylpropanes).

In a second part of the work, the mosquito larvicidal activities of lavender, fennel and parsley EOs were evaluated by larvicidal assays conducted against third instars larvae of the *An. atroparvus* mosquito in the IHMT (Lisbon). The EOs were tested as emulsions in water in a range of optimized concentrations. A statistic approach was achieved using the SPSS 16.0 software for Log-Probit analysis

and determination of lethality parameters (LC₅₀ and LC₉₀) at 24 and 48h of time exposure. Lavender EO was considered ineffective while both EOs from wild fennel showed a satisfactory lethal effect. The EO from fennel vegetative parts showed little more effectiveness in killing 50% of larvae (LC₅₀=50 ppm and LC₅₀=39 ppm, at 24 and 48h). However, lethal concentrations of fennel infrutescences EO inducing 90% of mortality (LC₉₀=107 ppm at 24h and LC₉₀=96 ppm at 48h) were lower than the lethal concentrations determined for vegetative parts (LC₉₀=129 ppm at 24h and LC₉₀=110 ppm at 48h). Larvicidal activity of fennel infrutescence EO can be related with the *trans*-anethole content. Moreover, the results evidenced by vegetative parts indicate that other existing compounds (estragole, fenchone, etc.) could be as well active as this one. The EO from parsley infrutescences showed an acute toxicity.

Índice

	Pág.
Agradecimentos	iii
Título e Resumo	v
Title and Abstract	vii
Índice	ix
Lista de Abreviaturas	xii
Lista de Figuras	xiv
Lista de Tabelas	xvii
 1. Introdução	 1
1.1. Espécies vegetais em estudo e sua importância.....	3
1.1.1. <i>Lavandula angustifolia</i> Miller.....	3
1.1.2. <i>Foeniculum vulgare</i> Miller ssp. <i>vulgare</i>	5
1.1.3. <i>Anethum graveolens</i> L.....	8
1.1.4. <i>Petroselinum crispum</i> (Miller) A.W. Hill	9
1.2. Biossíntese, acumulação e caracterização dos Óleos Essenciais (OEs) das plantas em estudo.....	11
1.2.1. Natureza química e biossíntese dos constituintes de OEs.....	11
1.2.2. Acumulação de OE e sua localização em órgãos.....	14
1.2.3. Caracterização dos OEs.....	15
1.2.3.1. Os constituintes terpenóides em <i>L. angustifolia</i>	16
1.2.3.2. Os fenilpropanóides em <i>F. vulgare</i> , <i>A. graveolens</i> e <i>P. crispum</i>	18
1.3. Biotecnologia vegetal de <i>L. angustifolia</i> , <i>F. vulgare</i> , <i>A. graveolens</i> e <i>P. crispum</i>	21
1.3.1. Estudos fitoquímicos de culturas <i>in vitro</i> e optimização da produção	22
1.4. Bio-insecticidas	25
1.4.1. O desenvolvimento dos bio-insecticidas de origem vegetal	26
1.4.1.1. Fragrâncias vegetais como estratégia bioracional no controlo de insectos	29

	Pág.
1.4.2. Actividades anti-insecto.....	30
1.4.2.1. Modos de acção de insecticidas	32
1.4.2.2. Potencialidades e resultados de actividades anti-insecto de fragrâncias vegetais	35
1.4.3. Novas formulações para a aplicação de insecticidas - “ <i>Delivery systems</i> ”	38
1.4.4. Os Culicídeos: Insectos vectores de agentes patogénicos	39
1.4.4.1. O mosquito <i>Anopheles atroparvus</i> van Thiel, 1927 (Diptera, Culicidae): um vector da Malária na Europa	43
1.5. Objectivos	48
2. Material e Métodos	49
2.1. Culturas <i>in vitro</i>	51
2.1.1. Culturas <i>in vitro</i> de <i>L. angustifolia</i>	52
2.1.1.1. Micropropagação e Calogénese	53
2.1.2. Culturas <i>in vitro</i> de plantas da família Apiaceae	54
2.1.2.1. Estabelecimento das culturas: Desinfecção, germinação e crescimento de <i>F. vulgare</i> var. <i>vulgare</i> , <i>A. graveolens</i> e <i>P. crispum</i>	54
2.1.3. Indução de <i>Hairy roots</i> em espécies de Apiaceae por infecção com <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	59
2.2. Composição dos OEs produzidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> por <i>L. angustifolia</i> , <i>F. vulgare</i> var. <i>vulgare</i> , <i>A. graveolens</i> e <i>P. crispum</i> ssp. <i>neapolitanum</i>	61
2.2.1. Origem, tipologia e amostragem do material.....	61
2.2.2. Extracção dos OEs	67
2.2.3. Análise quantitativa e qualitativa dos constituintes de OEs.....	68
2.3. Estudo do efeito larvicida de OEs de <i>L. angustifolia</i> , <i>F. vulgare</i> var. <i>vulgare</i> , <i>P. crispum</i> spp. <i>neapolitanum</i> contra <i>Anopheles atroparvus</i>	71
2.3.1. Manutenção das colónias do mosquito alvo: <i>An. atroparvus</i>	71
2.3.2. Bio-ensaios	73
2.3.2.1. Plano experimental e previsão das necessidades.....	73
2.3.2.2. Ensaios preliminares e optimização da metodologia	75
2.3.2.2.1. Escolha do agente emulsionante, avaliação da capacidade emulsionante e toxicidade nas larvas	76
2.3.2.2.2. Ensaios prévios e definição das concentrações a testar	78
2.3.2.3. Determinação do efeito larvicida dos OEs no mosquito <i>An. atroparvus</i>	79

	Pág.
3. Resultados e Discussão	83
3.1. Culturas <i>in vitro</i>	85
3.1.1. Culturas <i>in vitro</i> de <i>L. angustifolia</i> : Micropropagação e Calogénese	85
3.1.2. Estabelecimento e desenvolvimento das culturas <i>in vitro</i> de Apiaceae	89
3.1.2.1. Cultura <i>in vitro</i> de <i>F. vulgare</i> var. <i>vulgare</i>	89
3.1.2.2. Cultura <i>in vitro</i> de <i>A. graveolens</i>	92
3.1.2.3. Cultura <i>in vitro</i> de <i>P. crispum</i> ssp. <i>neapolitanum</i>	93
3.1.3. Indução de <i>Hairy roots</i> por infecção com <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	97
3.2. Composição dos OEs	101
3.2.1. Caracterização dos OEs de <i>Lavandula angustifolia</i>	101
3.2.2. Caracterização dos OEs de <i>Foeniculum vulgare</i> var. <i>vulgare</i>	106
3.2.3. Caracterização dos OEs de <i>Petroselinum crispum</i> ssp. <i>neapolitanum</i>	113
3.2.4. Caracterização dos OEs de <i>Anethum graveolens</i>	118
3.3. Estudo do efeito larvicida de OEs de <i>L. angustifolia</i> <i>F. vulgare</i> var. <i>vulgare</i> , <i>P. crispum</i> ssp. <i>neapolitanum</i> contra <i>Anopheles atroparvus</i>	121
3.3.1. Ensaio preliminar	121
3.3.1.1. Escolha do agente emulsionante, avaliação da capacidade emulsionante e toxicidade nas larvas	121
3.3.1.2. Ensaio prévio e definição das concentrações dos OEs a aplicar nos bio - ensaios	123
3.3.2. Efeito larvicida dos OEs	125
4. Considerações Finais e Perspectivas Futuras	131
5. Referências Bibliográficas	135
6. Anexos	149

Lista de Abreviaturas/Siglas

AChe	Acetilcolinaesterase
AMP	Adenosine Monophosphate
atm	atmosfera
ATP	Adenosine Triphosphate
BA	6-Benzilaminopurina ou Benziladenina
CL	Concentração Letal
cm	centímetro(s)
CoA	Coenzima-A
DDT	DicloDifenilTricloroetano
DMAPP	Dimetilalil Pirofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DXP	D-1-desoxixilulose-5-fosfato
FID	Flame Ionization Detector
FPP	Farnesil difosfato
g	grama(s)
GABA	Gamma Aminobutiric Acid
GAP	Gliceraldeído-3-fosfato
GC	Gas Chromatography
GC-MS	Gas Chromatography and Mass Spectrometry
GGPP	Geranil Geranil Difosfato
GPP	Geranil Difosfato
h	hora(s)
HD	Hidrodestilação
HMG	Hidroximetil Glutaril
IHMT	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
IPP	Isopentenil Pirofosfato
ISO	International Standardisation Organisation
kg	kilogramma(s)
KI	Índice de Kovats
l	litro(s)
LB	Lisogeny Broth medium (Bertani, 1951)
m	metro(s)
m²	metro(s) quadrado(s)

min.	minuto(s)
ml	mililitro(s)
mm	milímetro(s)
MS	Murashige & Skoog medium (1962)
MVA	Mevalonic Acid (mevalonato)
Nº	Número(s)
OE(s)	Óleo(s) Essencial(ais)
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	peso
PAM	Plantas Aromáticas e Medicinais
PAR	Photosynthetic Active Radiation
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polietileno Glicol
PPG	Polipropileno Glicol
ppm	parte(s) por milhão
Psi	Unidade de Pressão no sistema Inglês
rd	residual
rpm	rotações por minuto
s	segundo(s)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sin.	sinónimo
sp.	espécie
ssp.	subespécie
T.	Temperatura
tr.	tempo de retenção
v	volume
var.	variedade
UV	Ultra-Violeta
VgSCh	Voltage Gated Sodium Channels
%	percentagem
2,4-D	ácido Diclorofenoxiacético
µmol	micromoles
°C	Grau(s) Célsius

Lista de Figuras

Número da Figura	Legenda da Figura	Pág.
Figura 1.	Ilustração botânica de uma ramificação de <i>Lavandula angustifolia</i> Miller, suportando eixos florais.	4
Figura 2.	Ilustração botânica de <i>Foeniculum vulgare</i> Miller, incluindo as inflorescências, infrutescências assim como a estrutura e o tipo de semente (aquênios).	6
Figura 3.	Ilustração botânica de <i>Anethum graveolens</i> L. com pormenores das inflorescências, infrutescências e tipo de frutos.	8
Figura 4.	Ilustração botânica de <i>Petroselinum crispum</i> (Mill) Nym ex A.W. Hill representando toda a planta, incluindo a raiz, as flores e os frutos.	9
Figura 5.	Esquema representando a via biogenética de alguns dos fenilpropanóides existentes nos óleos essenciais de plantas e putativas relações entre principais substratos e produtos.	13
Figura 6.	Representação das estruturas moleculares de alguns terpenóides mais comuns presentes nos óleos essenciais de <i>Lavandula angustifolia</i> .	17
Figura 7.	Representação estrutural de alguns fenilpropanóides.	19
Figura 8.	Representação estrutural de diversos compostos de origem vegetal com actividades anti-insecto. 1- Rotenona (<i>Derris elliptica</i>); 2- Piretrina I (<i>Tanacetum cinerariifolium</i>); 3-Nicotina (<i>Nicotiana tabacum</i>); 4 - Azadiractina (<i>Azadirachta indica</i>).	27
Figura 9.	Fotografia de culicídeos adultos pertencentes à espécie <i>Anopheles atroparvus</i> van Thiel, 1927 (anofelíneos).	41
Figura 10.	Fotografias das observações ao estereomicroscópio das duas últimas fases de desenvolvimento aquáticas de um culicídeo anofelíneo, <i>Anopheles atroparvus</i> , van Thiel, 1927.	41
Figura 11.	Fotografias dos diferentes estádios de desenvolvimento aquático do mosquito anofelíneo: <i>An. atroparvus</i> van Thiel, 1927, tiradas aquando da observação ao estereomicroscópio de exemplares vivo.	44
Figura 12.	Apresentação esquemática do ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> sp. entre o hospedeiro humano (fase esquizogónica) e o mosquito (fase esporogónica).	46
Figura 13.	Fotografia dos diferentes tipos de explantes seccionados a partir de plantas de <i>P. crispum</i> adulta e desinfectados, na tentativa de estabelecimento de culturas <i>in vitro</i> .	59
Figura 14.	Fotografia de um arbusto de <i>Lavandula angustifolia</i> em plena floração no mês de Agosto com hastes compridas suportando espigas florais maduras.	61
Figura 15.	Fotografias das diferentes tipologias de material vegetal colhidas a partir de exemplares de funcho silvestre identificado como <i>Foeniculum vulgare</i> var. <i>vulgare</i> colhido em S. Paio de Merelim, Braga (fotos cedidas pela Liliane Gomes).	63
Figura 16.	Fotografias da tipologia de material vegetal utilizado para extracção de óleos essenciais de <i>Petroselinum crispum</i> (salsa).	63

Figura 17.	Fotografia das partes vegetativas de aneto jovem (<i>Anethum graveolens</i>) utilizadas para extracção do OE e análise fitoquímica.	65
Figura 18.	Sistemas utilizados na manutenção das colónias de mosquitos na Unidade de Entomologia Médica do IHMT.	72
Figura 19.	Larvas vivas de <i>An. atroparvus</i> em cultura no 3º estágio do seu desenvolvimento.	72
Figura 20.	Resumo esquematizado do procedimento experimental e resultados obtidos com culturas <i>in vitro</i> de <i>Lavandula angustifolia</i> .	86
Figura 21.	Culturas <i>in vitro</i> de rebentos caulinares de <i>Lavandula angustifolia</i> obtidas por micropropagação de segmentos nodais em meio MS suplementado com BA (0,5 mg/l) após três semanas de cultura.	87
Figura 22.	Fotografias de cultura <i>in vitro</i> de <i>calli</i> de <i>L. angustifolia</i> em meio sólido.	89
Figura 23.	Plantas de <i>Foeniculum vulgare</i> var. <i>vulgare</i> germinadas e crescidas <i>in vitro</i> em meio MS a partir de sementes colhidas em espécie silvestres.	91
Figura 24.	Plantas <i>in vitro</i> de <i>Anethum graveolens</i> obtidas por germinação de sementes comerciais em ½ meio MS e desenvolvidas em meio MS completo.	93
Figura 25.	Germinação <i>in vitro</i> de semente comerciais de <i>Petroselinum crispum</i> var. <i>neapolitanum</i> em agar e NaNO ₃ (0,2% p/p) e desenvolvimento das plantas em meio MS completo.	95
Figura 26.	Registos fotográficos dos sistemas radiculares de plantas de <i>Petroselinum crispum</i> evidenciando uma densa proliferação após um cultivo <i>in vitro</i> de dezasseis semanas em meio MS.	95
Figura 27.	Registo fotográfico dos resultados obtidos cerca de quatro semanas após a infecção dos segmentos de funcho e salsa com <i>A. rhizogenes</i> .	99
Figura 28.	Registos fotográficos do segmentos <i>A. graveolens</i> cerca de quatro semanas após terem sido sujeito a infecção com <i>A. rhizogenes</i> .	99
Figura 29.	Culturas <i>in vitro</i> de <i>hairy roots</i> (raízes em cabeleira) e raízes não transformadas de <i>Anethum graveolens</i> em meio MS sólido.	100
Figura 30.	Fotografia ilustrando as diferenças visuais que foram observadas na fase orgânica (óleo essencial) e na fase aquosa, no início (a) e final (b) da hidrodestilação, respectivamente.	106
Figura 31.	Representações gráficas das curvas de mortalidade obtidas para o ensaio prévio após 24h de exposição das larvas às emulsões.	123
Figura 32.	Fotografias da observação ao estereomicroscópio de larvas do terceiro estágio do mosquito <i>Anopheles atroparvus</i> antes e depois da exposição às emulsões de óleos essenciais.	124
Figura 33.	Gráficos Log-Probit (ordenadas escala probit e abcissas Log concentração) com rectas de regressão para a determinação das CL50 e CL90 dos óleos essenciais após um período de 24h de exposição.	125
Figura 34.	Fotografias ilustrando os comportamentos das larvas de <i>An. atroparvus</i> observados ao longos dos ensaios larvicidas com óleo essencial (OE) de infrutescências de salsa após algum tempo de exposição aos OEs.	129

Figura 35.	Representação gráfica dos valores de mortalidade média registados para os três óleos essenciais mais bio-activos contra as larvas de <i>An. atroparvus</i> ao longo de 48h de ensaio a uma diluição de 75 ppm.	130
Figura A1.	Cromatogramas obtido por análise GC-MS de óleos essenciais (OEs) provenientes de <i>L. angustifolia</i>	161
Figura A2.	Cromatogramas obtido por análise GC-MS de óleos essenciais (OEs) provenientes de <i>F. vulgare</i> var. <i>vulgare</i> .	162
Figura A3.	Cromatogramas obtido por análise GC-MS de amostras de óleos essenciais (OEs) de <i>P. crispum</i> var <i>neapolitanum</i> .	163
Figura A4.	Cromatogramas obtidos por análise em GC-MS de amostras de óleos essenciais de <i>Anethum graveolens</i> .	164

Lista de Tabelas

Número da Tabela	Legenda da Tabela	Pág.
Tabela 1.	Seleccção limitada de alguns estudos fitoquímicos desenvolvidos por diversos autores relativamente ao óleo essencial de flores de <i>L. angustifolia</i> , aplicando o processo de destilação como método de extracção.	18
Tabela 2.	Modos de acção dos 100 insecticidas/acaricidas mais vendidos, percentagens de vendas no ano 1999 e exemplos de compostos comercializados.	32
Tabela 3.	Apresentação resumida das actividades larvicidas de óleos essenciais de plantas contra várias espécies de mosquito.	37
Tabela 4.	Breve sumário das principais espécies de mosquito vectores envolvidos na transmissão de agentes patogénicos causadores de graves doenças e elevada mortalidade em todo o mundo.	42
Tabela 5.	Dados relativos às colheitas de material vegetal de <i>L. angustifolia</i> (alfazema), <i>F. vulgare</i> var. <i>vulgare</i> (funcho amargo), <i>A. graveolens</i> (aneto) e <i>P. crispum</i> spp. <i>neapolitanum</i> (salsa de folha lisa).	64
Tabela 6.	Dados relativos às amostragens de culturas <i>in vitro</i> de <i>L. angustifolia</i> (alfazema), <i>F. vulgare</i> var. <i>vulgare</i> (funcho), <i>A. graveolens</i> (aneto) e <i>P. crispum</i> spp. <i>neapolitanum</i> (salsa).	66
Tabela 7.	Previsões das necessidades inerentes à realização de bio-ensaios para testar o efeito larvicida de óleos essenciais nas larvas de <i>An. atroparvus</i> .	74
Tabela 8.	Previsões das possíveis concentrações a testar e dos volumes totais de cada óleo essencial necessários para a realização de quatro réplicas por ensaio.	75
Tabela 9.	Amostras dos óleos essenciais (OEs) utilizadas nos bio-ensaios, volumes de OEs e conjuntos de concentrações finais aplicadas nas emulsões.	80
Tabela 10.	Resultados da obtenção de raízes em a segmentos peciolares e internodais de plantas <i>in vitro</i> de <i>Anethum graveolens</i> registados cerca de seis semanas após a infecção com <i>A. rhizogenes</i> .	98
Tabela 11.	Rendimentos em óleo essencial das hidrodestilações de eixos florais colhidos de plantas de <i>Lavandula angustifolia</i> cultivadas num campo experimental em Braga (Lamações).	101
Tabela 12.	Caracterização dos óleos essenciais (OEs) extraídos de eixos florais de <i>Lavandula angustifolia</i> colhidos em Agosto de 2008 a partir de arbustos em plena floração num campo experimental em Lamações (Braga) e de rebentos caulinares cultivados <i>in vitro</i> em meio MS com BA (0,5 mg/l) durante dezasseis semanas de cultura.	102-104
Tabela 13.	Rendimentos em óleo essencial das hidrodestilações de funcho silvestre (<i>Foeniculum vulgare</i> var. <i>vulgare</i>) desenvolvido em população espontânea em S. Paio de Merelim (Braga).	107

Tabela 14.	Caracterização dos óleos essenciais (OEs) de infrutescências frescas (frutos e umbelas) e partes vegetativas de <i>Foeniculum vulgare</i> var. <i>vulgare</i> colhidas em Outubro de 2008 numa população silvestre crescida em S. Paio de Merelim (braga) e de plântulas germinada e cultivada <i>in vitro</i> em meio MS durante doze semanas.	110- 111
Tabela 15.	Rendimentos em óleo essencial das hidrodestilações de plantas de <i>Petroselinum crispum</i> spp. <i>neapolitanum</i> (salsa) em cultivo no campo.	113
Tabela 16.	Caracterização dos óleos essenciais (OEs) de <i>Petroselinum crispum</i> spp. <i>neapolitanum</i> extraído de amostras de plantas cultivadas em campo (infrutescências e partes vegetativas) e plântulas germinadas e desenvolvidas <i>in vitro</i> em meio MS durante doze semanas.	114- 116
Tabela 17.	Caracterização do óleo essencial (OE) de uma amostra de partes vegetativas de plantas de <i>Anethum graveolens</i> cultivadas <i>in vivo</i> pela Empresa Ervas Finas (Vila Real) e do OE extraído de plântulas obtidas por germinação <i>in vitro</i> de sementes comerciais e desenvolvidas em meio MS durante doze semanas.	119- 120
Tabela 18.	Avaliação da actividade larvicida dos óleos essenciais de <i>Foeniculum vulgare</i> var. <i>vulgare</i> e <i>Lavandula angustifolia</i> no terceiro estágio larvar do mosquito <i>Anopheles atroparvus</i> após 24h e 48h de exposição.	126
Tabela A1.	Caracterização dos óleos essenciais (teores absolutos dos constituintes) extraídos de eixos florais de <i>Lavandula angustifolia</i> colhidos em Agosto de 2008 a partir de arbustos em plena floração num campo experimental em Lamações (Braga) e de rebentos caulinares cultivados <i>in vitro</i> em meio MS com BA (0,5 mg/l) durante dezasseis semanas de cultura.	151- 153
Tabela A2.	Caracterização dos óleos essenciais (OEs) (teores absolutos dos constituintes) de infrutescências frescas (frutos e umbelas) e partes vegetativas de <i>Foeniculum vulgare</i> var. <i>vulgare</i> colhidas em Outubro de 2008 numa população silvestre crescida em S. Paio de Merelim (Braga) e de plântulas germinadas e cultivadas <i>in vitro</i> em meio MS durante doze semanas.	154- 155
Tabela A3.	Caracterização dos óleos essenciais (OEs) (teores absolutos dos constituintes) de <i>Petroselinum crispum</i> spp. <i>neapolitanum</i> extraídos de plantas cultivadas em campo (infrutescências e partes vegetativas) e plântulas germinadas e desenvolvidas <i>in vitro</i> em meio MS durante doze semanas.	156- 158
Tabela A4.	Caracterização (teores absolutos dos constituintes) do óleo essencial (OE) de caules e folhas jovens de plantas de <i>Anethum graveolens</i> cultivadas <i>in vivo</i> pela Empresa Ervas Finas (Vila Real) e do respectivo OE extraído de plântulas obtidas por germinação <i>in vitro</i> e desenvolvidas em meio MS durante doze semanas.	159- 160

1. | Introdução

1.1. Espécies vegetais em estudo e sua importância

1.1.1. *Lavandula angustifolia* P. Miller

As Lavandas ou alfazemas são plantas arbustivas perenes ou subarbustivas anuais pertencentes ao género *Lavandula*. Este género, inserido na família das Lamiáceas (Lamiaceae ou Labiatae), inclui espécies que partilham características morfológicas tais como: caules de secção quadrada, folhas opostas oblongas a lanceoladas ou por vezes tomentosas e flores bilabiadas (Segura e Calvo, 1991). As lavandas são plantas endémicas dos países mediterrânicos crescendo frequentemente em altitude em locais quentes e com pouca precipitação (tendência xerofítica). Embora o nome vulgar alfazema seja conhecimento comum, na realidade, são poucas as espécies deste género a chegar até nós. A alfazema verdadeira (*L. angustifolia*), a alfazema “aspic” (*L. latifolia*), o híbrido lavandin (*L. x intermedia* Emeric ex Loisel) e a alfazema Francesa ou rosmaninho (*L. stoechas* L.) são as principais espécies em cultivo, comercializadas com o propósito de extracção dos seus OEs ou como plantas de jardim (Segura e Calvo, 1991).

A espécie mais comum é designada de *Lavandula angustifolia* P. Miller (sin. *L. officinalis* Chaix ou *L. vera* D.C.), conhecida como lavandula inglesa ou alfazema-verdadeira. *L. angustifolia* é endémica de regiões do Oeste do Mediterrâneo, surgindo espontaneamente em solos secos, calcários/argilosos em terreno rochoso e ensolarado protegidos do vento, entre 600 e 1000 metros de altitude. Em Portugal esta espécie não é espontânea mas é muito cultivada como ornamental (da Cunha *et al.*, 2007).

Quando adulta *L. angustifolia*, apresenta-se como planta arbustiva muito ramificada, atingindo geralmente 60 cm de altura. Os seus ramos erectos são constituídos por folhas estreitas (2 a 5 cm) de cor verde-acinzentada opostas e lanceoladas com os bordos enrolados. No momento da floração (entre Junho a Agosto) os ramos formam espigas ou eixos florais principais e laterais, constituídos por pequenas flores de coloração azul-púrpura organizadas em verticilos em grupos de seis ou dez flores (figura 1) conforme as variedades. A revestir as flores e folhas, encontram-se, em abundância, vários tipos de tricomas, entre os quais os tricomas secretores onde são acumulados os óleos essenciais (OEs) (Segura e Calvo, 1991).

O sucesso comercial das espécies de *Lavandula* é maioritariamente devido à componente volátil (OE) cujos usos na indústria da perfumaria e cosmética remontam a muitos anos de tradição, especialmente nos países produtores como a França. Outros países como a Inglaterra, Bulgária, Rússia, Índia, Austrália e Estados-Unidos têm vindo igualmente a distinguir-se pela elevada produção de alfazemas (Segura e Calvo, 1991). Os OEs são geralmente incorporados em inúmeros produtos de cosmética, águas-de-colónia, perfumes, loções, sabonetes, etc. (Chemat *et al.*, 2006). Além disso, possuem várias aplicações na indústria alimentar como aromatizantes de bebidas, geleias, doces, gelados, rebuçados ou preparação de certos tipos de queijos (Chemat *et al.*, 2006).

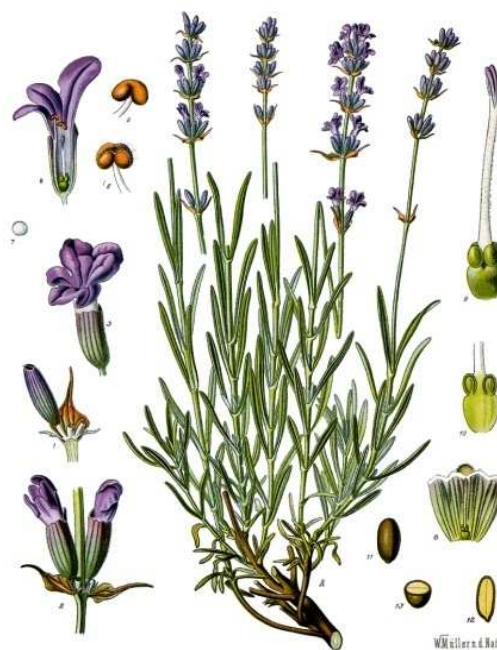


Figura 1. Ilustração botânica de uma ramificação de *Lavandula angustifolia* Miller, suportando eixos florais. Pormenores das flores com estruturas reprodutoras femininas e masculinas e endosperma. Autor: Franz Eugen Köhler "Koepler's Medicinal-Plants", 1887. Extraído de <http://www.illustratedgarden.org/mobot/rarebooks>

Conhecem-se algumas aplicações etnobotânicas para as espécies deste género sendo, *L. angustifolia* indiscutivelmente uma das mais usadas. Em fitoterapia, as suas flores são usadas para acalmar estados de ansiedade, agitação e insónias apresentando também propriedades antiespasmódicas e coleréticas (da Cunha *et al.*, 2007). Quando aplicado, o OE apresenta actividade anti-séptica e cicatrizante em feridas, analgésica em dores reumáticas, sedativa e hipotensora (da Cunha *et al.*, 2007). A existência de 1,8-cineole nos OEs de *L. angustifolia* foi considerada como uma explicação muito plausível para a actividade analgésica (Santos e Rao, 2000; Hajhashemi *et al.*, 2003). Por outro lado, a aromaterapia, com ou sem massagens, constitui a principal área de aplicação dos OEs de alfazema, sendo eficazes no tratamentos de insónia ou como sedativo para o alívio das dores. Este efeito calmante e relaxante dos EOs de *L. angustifolia* indica uma provável acção sobre o sistema nervoso central. O linalool foi considerado o constituinte mais farmacologicamente activo envolvido no efeito anxiolítico do OE de alfazema (Umezu *et al.*, 2006). Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de compreender o seu modo de acção nas funções cerebrais (Umezu *et al.*, 2006).

Em usos mais caseiros, as flores são utilizadas para perfumar o ambiente e a roupa nomeadamente para prevenir os danos causados pelas traças ou como repelente contra os mosquitos. De facto, conhecem-se algumas actividades anti-insecto do OE, as quais serão tratadas com mais atenção na secção 1.4.2.2.

A caracterização fitoquímica dos OEs de alfazemas tem suscitado uma vasta investigação (Skoula *et al.*, 1996; Angionini *et al.*, 2006; Munõz-Bertomeu *et al.*, 2007) sendo descrita com mais pormenor na secção 1.2.3.1. Para além dos constituintes dos OEs, outros tipos de metabolitos secundários presentes na planta têm sido alvo de estudos. De entre estes, têm sido identificados compostos diterpénicos (Politi *et al.*, 2002) e triterpénicos (Topçu *et al.*, 2001), parafinas (Reverchon e Della Porta, 1995), lactonas (Timmer *et al.*, 1975), cumarinas (Shimizu *et al.*, 1990), flavonas (Suárez-Cervera e Seoane-Camba, 1986; Gabrieli e Kokkalou, 2003) e uma grande variedade de compostos fenólicos (Andrade *et al.*, 1998 e 2000; Proestos *et al.*, 2006)

1.1.2. *Foeniculum vulgare* Miller ssp. *vulgare*

Em termos taxonómicos o género *Foeniculum* pertence à família Apiaceae (Umbelliferae). Este género é mono-específico o que significa que *F. vulgare*, anteriormente designada *Foeniculum officinalis*, é a única espécie representativa do género. No entanto, esta é muito polimorfa, dividindo-se em duas subespécies: *F. vulgare* ssp. *vulgare* ou *capillaceum* (Gilib.) Holmboe e *F. vulgare* ssp. *piperitum* (Ucria) Coutinho. Por seu lado, a subespécie *vulgare* é ainda subdividida em três variedades distintas, designadas de *F. vulgare* ssp. *vulgare* var. *vulgare*, *F. vulgare* ssp. *vulgare* var. *dulcis* e *F. vulgare* ssp. *vulgare* var. *azoricum* (Barbosa *et al.*, 2007).

O funcho (figura 2) é uma espécie alógama cuja polinização cruzada é principalmente realizada por insectos Dípteros e Himenópteros (polinização entomófila) (Badoc *et al.*, 1995). É uma planta herbácea anual, bianual ou perene, dependendo da variedade. Apresenta-se geralmente glauca e glabra (sem indumento piloso) com caule estriado, podendo crescer até 2m de altura. As suas folhas muito recortadas, penactissectas, apresentam um contorno mais ou menos triangular com segmentos filiformes de 5 a 50 mm, acuminados, geralmente bem afastados e não dispostos no mesmo plano. Os pecíolos das folhas são invaginantes de 3 a 6 cm. As umbelas distinguem-se pelo seu número de raios variáveis (4 a 30) e as inflorescências, sem brácteas ou bractéolas, suportam flores de pétalas amarelas (Valdés *et al.*, 1987). A floração decorre geralmente entre Julho a Novembro (Sampaio,

1988) e os frutos (ovóide-oblongo 4 a 10 mm) apresentam estrias fortes e proeminentes com canais resiníferos solitários (da Cunha *et al.*, 2007).

Foeniculum vulgare ssp. *vulgare* var. *vulgare*, também designado de funcho amargo, é uma planta muito comum, nativa da bacia Mediterrânica, tradicionalmente usada como erva culinária e medicinal. O funcho é uma espécie Mediterrânea típica mas já perfeitamente instalada noutras zonas de clima temperado (no Norte da Europa, na América do Norte e na Austrália). Devido à sua grande plasticidade, o funcho foi facilmente introduzido em vários locais do globo, crescendo agora espontaneamente (Barbosa *et al.*, 2007). O funcho silvestre adapta-se bem a vários tipos de clima desde que tenha boa exposição ao sol, solos férteis e bem drenados (Barbosa *et al.*, 2007). Porém, tende a preferir bordaduras de caminhos e de campos de cultivo, em locais secos, baldios descampados ou taludes pedregosos. É espontâneo e relativamente vulgar um pouco por todo o país em locais abrigados, quentes e soalheiros (da Cunha *et al.*, 2007).



Figura 2. Ilustração botânica de *Foeniculum vulgare* Miller, incluindo as inflorescências, infrutescências assim como a estrutura e o tipo de semente (aquénios). Autor: Otto Wilhelm Thomé: *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz* (1885). Extraído de: <http://caliban.mpizkoeln.mpg.de/thome/index.html>

As três variedades de *F. vulgare* ssp. *capillaceum* têm sido cultivadas, embora com finalidades distintas. A variedade *azoricum*, também designada de funcho Italiano, é uma hortícola muito conhecida pelo seu bolbo hipertrofiado, à semelhança de *Apium graveolens* (aipo) (Hulnaut *et al.*, 1989). As duas restantes variedades são ambas fontes de essências para a indústria alimentar e a perfumaria, embora a variedade *vulgare* seja mais rica em OE. Assim, o funcho é uma planta de grande valor industrial e uma das principais fontes de anetole, um composto com ampla utilização alimentar. O *trans*- anetole é o produto com maior importância económica extraído de ambas as variedades (Hulnaut *et al.*, 1989). A planta tem sido amplamente cultivada na Índia e em menor escala nos países mediterrânicos (Egipto, Turquia, Grécia, Espanha e França) (Hulnaut *et al.*, 1989).

Por vezes, a subespécie *piperitum* pode ser confundida com um quimiótipo da variedade *vulgare* que também é espontânea. No entanto, esta subespécie não é cultivada e não apresenta uma fragrância anisada (Muckensturm *et al.*, 1997). A subespécie *vulgare* é mais atlântica enquanto a subespécie *piperitum* é marcadamente mediterrânica (Barbosa *et al.*, 2007). Frequentemente, a subespécie *vulgare* revela-se bienal, ao contrário da subespécie *piperitum* que é sempre perene. Esta última distingue-se da primeira pelas lacínias foliares mais curtas (0,5- 2 cm) e rígidas, mas sub-carnudas, assim como pelas umbelas menores de 6-12 raios e frutos accentuadamente apimentados (Sampaio, 1988). Na subespécie *piperitum*, as umbelas terminais são geralmente ultrapassadas pelas laterais (da Cunha *et al.*, 2007). Enquanto o OE de *F. vulgare* ssp. *vulgare* tem sido objecto de numerosos estudos (Lamarti *et al.*, 1993a; Barazani *et al.*, 2002; Stefanini *et al.*, 2006) *F. vulgare* ssp. *piperitum* tem sido menos investigada (Piccaglia e Maroti, 2001).

Em termos de utilizações, os frutos de funcho são conhecidos pela sua acção mucolítica, anti-septica, antiespasmódica e digestiva sendo muito usados como expectorante ou como carminativo contra cólicas abdominais e flatulências. Por outro lado, o seu efeito estrogénico permite usar as sementes como galactogénicos (estimulação da produção de leite) (da Cunha *et al.*, 2007). Porém os frutos são principalmente usados como aromatizantes ou correctores de sabores em licores, medicamentos, pasta de dentes e pastelaria. As folhas, por seu lado, têm uma utilização mais culinária podendo ser usadas na aromatização de peixes, molhos, saladas e sopas (da Cunha *et al.*, 2007).

As essências do funcho encontram-se distribuídas pela planta, embora com maior abundância nas partes superiores, designadamente nos frutos (2 a 6 % de OE). Adicionalmente, os frutos apresentam na sua composição outro tipo de compostos tais como polissacáridos, fitoesteróis (β -sitosterol e estigmasterol), cumarinas, flavonóides e ácidos orgânicos. Os polissacáridos, glúcidos e cumarinas (umbeliferona e bergapteno), também têm sido localizados ao nível das raízes, enquanto as folhas apresentam na sua constituição constituintes flavonóides, proteínas e o OE (da Cunha *et al.*, 2007). A composição dos OEs desta espécie, encontra-se extensamente reportada na bibliografia (Lamarti *et al.*, 1993a; Barazani *et al.*, 2002; Stefanini *et al.*, 2006) sendo alvo de descrição mais pormenorizada ao longo da discussão dos resultados do estudo fitoquímico realizados no âmbito deste trabalho (3.2.2.).

1.1.3. *Anethum graveolens* L.

Anethum graveolens L. (sin. *Anethum sowa* Roxb. ex Fleming, sin. *Peucedanum graveolens* (L.) Benth. & Hook. f., sin. *Peucedanum sowa* (Roxb. ex Fleming) Kurz) de nome comum aneto, endro ou funcho-bastardo (figura 3), é uma espécie herbácea muito aromática pertencente à família Apiaceae (Umbelliferae) (da Cunha *et al.*, 2007). Esta pequena planta (20 a 50 cm de altura) anual é nativa do Sul da Europa e encontra-se extensivamente cultivada no Centro e Este do continente assim como no Egipto (Everitt e Lockwood, 1995). Também se encontra em cultivo na Índia, sob a designação de *Anethum sowa* Roxb. ex Fleming que é sinónimo de *Anethum graveolens* L. Em Portugal o cultivo do aneto é pouco comum, ao contrário de outros países europeus, embora a planta possa surgir espontaneamente em terrenos incultos como infestante de searas, vinhedos e terras cultivadas a Sul do Mondego (Sul do país) e na Madeira (Sampaio, 1988; da Cunha *et al.*, 2007).

O aneto é uma planta glaucescente com caule oco e estriado. As folhas são decompostas tri- ou quadri-penatissectas e apresentam segmentos pontiagudos, rígidos e curtos terminando numa pequena arista (o mucrão). A floração ocorre de Abril a Agosto em umbelas compostas (inflorescências), sem brácteas, constituídas por 15 a 30 raios desiguais. As flores, de pétalas amarelas oblongas e ápices incurvados, dão origem a frutos cremocarpos (ou diaquénios). Estes frutos castanho-escuros (5 a 6 mm de comprimento) com asas laterais pálidas são fortemente comprimidos dorsalmente. Em volta dos frutos dispõem-se canais resiníferos solitários (da Cunha *et al.*, 2007).

As sementes e folhas são empregues como condimento devido ao sabor picante e aroma semelhante a cominhos e funcho (da Cunha *et al.*, 2007). São muito usadas em sopas, saladas molhos e pratos de peixe



Figura 3. Ilustração botânica de *Anethum graveolens* L. com pormenores das inflorescências, infrutescências e tipo de frutos. Autor: Otto Wilhelm Thomé: *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz* (1885). Extraído de: <http://caliban.mpizkoeln.mpg.de/thome/index.html>

(Huolupalahti e Linko, 1983), enquanto o OE é usado como aromatizantes na indústria de conservas alimentares (da Cunha *et al.*, 2007). Em fitoterapia, os frutos de aneto são usados para acalmar cólicas intestinais, estados de flatulência e outras perturbações dispépticas, à semelhanças do funcho. Uma acção mucolítica, espasmódica, galactogoga e diurética é igualmente atribuída ao aneto (da Cunha *et al.*, 2007).

Para além do seu OE (4%), os frutos apresentam igualmente triterpenos, flavonóides, cumarinas, xantonas, e sais minerais com um teor elevado de silício. As folhas são normalmente ricas em flavonóides, cumarinas glúcidos e sais (da Cunha *et al.*, 2007). A composição do aroma de aneto foi alvo de investigação entre as décadas de 70 a 80 (Huopalahti and Linko, 1983) e mais recentemente (Pino *et al.*, 1995; Bailer *et al.*, 2001). A descrição da composição dos OEs desta espécie será dicutida na secção 3.2.4.

1.1.4. *Petroselinum crispum* (Miller) A.W. Hill

A salsa, *Petroselinum crispum* (Mill.) Nym ex A.W. Hill (sin. *P. sativum* Hoffm ou *P. hortensis* Auct), é uma espécie naturalmente bianual de grande importância sendo, no entanto, cultivada como uma planta anual. Esta espécie, possivelmente originária do sudeste da Europa ou da Ásia ocidental, é cultivada em Portugal e em quase todo o mundo. Todavia pode surgir subespontâneamente e de modo ocasional como escapada de cultivo (da Cunha *et al.*, 2007).

Existem três tipos de salsa consideradas por alguns autores como subespécies (Petropolous *et al.* 2004) ou como variedades (Simon e Quinn, 1988). Petropolous e colaboradores (2004) distinguem a salsa de folha lisa como ssp. *neapolitanum*, a de folha frisada como ssp. *crispum* e a ssp. *tuberosum*, um tipo de salsa cultivada nalguns países essencialmente pela sua raiz.



Figura 4. Ilustração botânica de *Petroselinum crispum* (Mill) Nym ex A.W. Hill representando toda a planta, incluindo a raiz, as flores e os frutos. Autor: Franz Eugen Köhler "Koeher's Medicinal-Plants", 1887. Extraído de <http://www.illustratedgarden.org>

Petroselinum crispum é uma planta herbácea cujos talos erectos, cilíndricos estriados e ramificados podem atingir até 80 cm de altura (Valdés *et al.*, 1987). As suas folhas recompostas (tri-pinatissectas), glabras e um pouco luzidias (Sampaio, 1988) apresentam contornos triangulares e segmentos acunheados tripartidos ou trifendidos, por vezes crespos em certas formas cultivadas (da Cunha *et al.*, 2007). A floração decorre entre Maio a Setembro, sendo as flores de cor amarelo-esverdeadas dispostas em umbelas de 10-16 raios subiguais, providas na base de brácteas e bracteólas (Valdés *et al.*, 1988). Os frutos têm uma forma ovóide a elipsóide de dimensões variáveis (entre 1,2-3,2 x 0,7-1,9 cm) e apresentam estrias proeminentes com canais resiníferos (da Cunha *et al.*, 2007).

As folhas da planta são usadas na alimentação humana como guarnição e como condimento indispensável. No entanto, a salsa também tem sido usada, desde os tempos mais remotos, como planta indutora de abortos (Appendino *et al.*, 1998). Este efeito é fundamentado pela toxicidade da planta e sua acção estimulante sobre a musculatura uterina (da Cunha *et al.*, 2007). Assim, devido à toxicidade do OE conferida por compostos como o apiole e a miristicina, deve evitar-se o uso durante a gravidez e amamentação, por crianças jovens ou doentes com perturbações neurológicas (da Cunha *et al.*, 2007). Os frutos têm utilizações favoráveis em fitoterapia, como espamolíticos e digestivos, permitindo tratar a amenorreia, dismenorreia e flatulência (da Cunha *et al.*, 2007). Por outro lado, o OE e a óleo-resina são empregues em perfumaria (sabonetos, perfumes masculinos, etc.) e o OE das folhas na indústria alimentar na preparação de pickles e aromatização de bebidas.

A salsa é uma fonte abundante de diversos compostos de metabolitos secundários (Appendino *et al.*, 1998). Os frutos contêm um elevado teor de OE (2 a 6%), para além de flavonóides (apiína), óleo, vestígios de furanocumarinas (bergapteno) e sais minerais (da Cunha *et al.*, 2007). O OE de folhas, de aroma mais característico, apresenta um menor rendimento não sendo por isso muito usual a sua extracção a partir de folhas (Simon e Quinn, 1988). Para além do OE (0,02 a 0,7%), as folhas apresentam igualmente flavonóides e vestígios de furanocumarinas (da Cunha *et al.*, 2007). As raízes, por seu lado, apresentam vestígios de OE, flavonóides (apiína), furanocumarinas (bergapteno), poliacetilenos (falconol), taninos e sais minerais (da Cunha *et al.*, 2007).

A descrição da composição dos OEs está bem documentada (Simon e Quinn, 1988; Masanetz e Grosch, 1998; Díaz-Maroto *et al.*, 2002), existindo igualmente estudos direccionados para outros constituintes (López *et al.*, 1999). Tal como outras espécies da família, a presença de compostos do tipo fenipropanóides nos OEs é uma característica importante e cuja descrição será feita na secção 1.2.3.2. da introdução e na discussão dos resultados relativos a esta espécie (secção 3.2.3.).

1.2. Biossíntese, Acumulação e Caracterização dos Óleos Essenciais (OEs) das Plantas em estudo

1.2.1. Natureza química e biossíntese dos constituintes de OEs

Os constituintes presentes nos OEs de plantas podem pertencer a classes de compostos de origens biossintéticas diferentes. Distinguem-se assim os constituintes terpenóides dos fenilpropanóides, com base na proveniência destes. Embora os terpenóides sejam os constituintes maioritários e mais frequentes dos OEs de uma grande variedade de plantas, quando presentes, os felipropanóides contribuem de forma significativa para o carácter aromático de alguns OEs, sendo assim indispensáveis (Sangwan *et al.*, 2001). Em termos de biogénese, os terpenóides e os fenilpropanóides (fenóis e éteres fenólicos) resultam de vias e precursores metabólicos totalmente distintos (Sangwan *et al.*, 2001). Enquanto a via dos terpenóides é relativamente bem conhecida e tem sido alvo de inúmeras publicações, artigos de revisão e capítulos de livros (Banthorpe *et al.*, 1972; Croteau, 1987; Sangwan *et al.*, 1991; Bramley, 1995), a biossíntese de fenilpropanóides específicos dos OEs carece de descrição relativamente a algumas vias metabólicas (Sangwan *et al.*, 2001).

Os primeiros trabalhos de caracterização estrutural dos terpenóides desenvolvidos por Wallach (1887) levaram à formulação da “lei do isopreno” que definia a molécula do isopreno, constituída por cinco átomos de carbono, como a unidade básica para a construção dos terpenóides como categoria de compostos naturais (Croteau, 1987). Mais tarde, Ruzicka (1953) estendeu a lei de Wallach para a “lei biogenética do isopreno”, propondo que todos os isoprenóides eram sintetizados a partir de uma molécula fundamental designada, desta vez, de “isopreno activo” (Bramley, 1995). A molécula activa de isopreno, que representa a unidade básica envolvida na biossíntese dos terpenóides, é actualmente designada por isopentenil pirofosfato (IPP). A reacção do IPP com o seu isómero, o dimetilalil pirofosfato (DMAPP), constitui o primeiro passo para a construção de moléculas lineares (geranil difosfato, farnesil difosfato e geranil geranil difostato) que, após determinadas reacções de ciclização, carboxilação/descarboxilação, oxidações/reduções, e outras, irão dar origem às diferentes classes de compostos terpenóides (Bramley, 1995).

Actualmente, são conhecidas duas vias biossintéticas responsáveis pela formação do IPP e consequentemente dos isoprenóides. A via clássica do Mevalonato (MVA) ocorre predominantemente

no citoplasma e mitocôndrias resultando na formação de esteróides, sesquiterpenos, ubiquinonas , etc. (Lichtenthaler, 1997). Esta via caracteriza-se pela condensação sequencial de três moléculas de acetil-CoA originando uma molécula de HMG-CoA (hidroximetil glutaril CoA) convertida para uma molécula de MVA pela acção da HMG-CoA reductase. Posteriormente, o MVA (com seis átomos de carbono) sofre duas fosforilações e uma descarboxilação resultando finalmente no IPP (Lichtenthaler, 1997). Além desta via, foi descoberta mais recentemente, em plantas, algas e bactérias, uma outra via de biossíntese de IPP independente de MVA. Esta “nova” via designada de DXP (desoxixilulose fosfato) ocorre predominantemente nos plastos e está associada à formação de hemi-terpenos, monoterpenos, diterpenos e tetraterpenos (Eisenreich *et al.*, 2001). Nesta via, verifica-se a formação de um intermediário com cinco átomos de carbono, o D-1-desoxixilulose-5-fosfato (DXP), em vez do MVA, a partir de dois precursores, o piruvato e o gliceraldeído-3-fosfato (GAP) (Lichtenthaler, 1997).

Existem muitas enzimas envolvidas na biossíntese dos terpenóides. As prenil transferases participam nas reacções de condensação do tipo cauda cabeça entre as moléculas dadoras do grupo prenil e o novo IPP, sendo responsáveis pela formação de geranyl difosfato (GPP) com dez átomos de carbono, farnesil difosfato (FPP) com quinze átomos de carbono e geranyl geranyl difosfato (GGPP) com vinte átomos de carbono. Foram já identificadas mais de vinte ciclases intervenientes nas reacções intramoleculares entre átomos de carbono, o que permite compreender a enorme variedade de compostos terpenóides que é possível encontrar na natureza (Charlwood e Bantorpe, 1991).

A nomenclatura das diferentes classes de terpenóides é feita em função do número de unidades de isopreno. Os hemi-terpenos são os compostos mais simples constituídos por uma única unidade de isopreno. Seguem-se os compostos com dez átomos de carbono, designados de monoterpenos, os de quinze átomos de carbono constituem a classe dos sesquiterpenos, os diterpenos apresentam vinte átomos de carbono, etc. Para um número superior a quarenta átomos de carbono os terpenóides apresentam a designação geral de poliprenóides (Bramley, 1995).

A designação de fenilpropanóide é aplicada a um largo grupo de compostos naturais muito distintos. O metabolismo deste grupo de compostos subdivide-se em muitas via metabólicas dando origem a milhares de compostos, alguns deles específicos de determinadas espécies (Weisshaar e Jenkins, 1998). Um dos mais importantes ramos metabólicos leva à produção de flavonóides, antocianinas e taninos (Weisshaar e Jenkins, 1998). A via principal, a partir da qual são originados os fenilpropanóides, é denominada de via do chiquimato. Esta via representa a via de biossíntese de

aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina) que ocorre unicamente em microrganismos e plantas. A via do chiquimato tem sido exaustivamente estudada e estima-se que, sob condições normais, cerca de 20% do carbono fixado pelas plantas seja direccionado para esta via (Sangwan *et al.*, 2001). Assim os fenilpropanóides que incluem um esqueleto do fenilpropeno (OEs) derivam maioritariamente da fenilalanina, embora a tirosina possa ser um precursor em menor extensão. Porém, o conhecimento sobre os mecanismos biológicos relativos à síntese específica de fenilpropanóides presentes nos OE (como o eugenol, a elemicina, etc.) é ainda limitado. Apesar de existirem alguns trabalhos desenvolvidos no intuito de elucidar as vias metabólicas que dão origem a este grupo de fenilpropanos, alguns aspectos da biossíntese permanecem ainda por esclarecer (Sangwan *et al.*, 2001).



Figura 5. Esquema representando a via biogénica de alguns dos fenilpropanóides existentes nos OEs de plantas e putativas relações entre principais substratos e produtos.

Esquema modificado a partir do que foi proposto por Sangwan *et al.* (2001) com introdução de uma alteração ao nível do precursor do anetole com base na publicação de Gross *et al.*, 2002.

Experiências levadas a cabo por marcação radioactiva revelaram que os fenilpropenos miristicina e elemicina, presentes em OEs de várias espécies, derivam, independentemente, de um precursor: o metil eugenol. Por outro lado, a miristicina tem sido indicada como o precursor do dillapiole (Nishizawa *et al.*, 1989). Sangwan e colaboradores (2001) propuseram um resumo da via e de possíveis precursores que estão na origem da formação dos fenilpropanóides existentes nos OEs (figura 5).

Segundo Kurkin (2003), a nomenclatura utilizadas por alguns autores ainda não é unânimemente aceite. Assim, os fenilpropanóides podem ser divididos em três grupos principais: (1) fenilpropanóides simples; (2) fenilpropanóides complexos; (3) fenilpropanóides relacionados biogeneticamente (Kurkin, 2003). A classificação de fenilpropanóides simples é atribuída a compostos derivados dos ácidos e álcoois cinâmicos, cinamidas, cinamaldeídos e fenilpropanos. Muitos destes derivados mais simples são de elevada importância em termos de actividade biológica. É o caso dos fenilpropanos, compostos que não apresentam grupo funcional oxigenado no fragmento propano e que ocupam um lugar especial no seio dos fenilpropanóides simples (Kurkin, 2003). Esta família de compostos tem uma vasta distribuição nas plantas. Contudo, não ocorre somente como constituintes de OEs mas igualmente na forma de glicosilados nos tecidos (Kurkin, 2003).

1.2.2. Acumulação de OE e sua localização em órgãos

Os voláteis dos OEs são sintetizados, armazenados e libertados para o ambiente por uma variedade de estruturas existentes na epiderme e no mesófilo de plantas (Sangwan *et al.*, 2001). Estas estruturas podem adoptar morfologias muito distintas (glândulas secretoras, tricomas glandulares, ductos secretores ou células secretoras) e localizar-se em folhas, caules, raízes, inflorescências e frutos. A morfologia e o tipo de estruturas tendem a ser característicos de determinado grupo taxonómico (Sangwan *et al.*, 2001).

A acumulação de OE em plantas pertencentes à família Lamiaceae ocorre em glândulas especializadas presentes na superfície das folhas. Distinguem-se dois tipos de tricomas secretores: os capitados ou peltados. Cada tipo de tricoma glandular é constituído por uma célula basal localizada na epiderme, um pedúnculo ou haste composta por uma a três células, e uma cabeça secretora terminal uni- ou multicelular (Sangwan *et al.*, 2001). Os produtos que se acumulam no interior dos tricomas são de natureza e biossíntese diversas, podendo ser de natureza hidrofílica ou lipofílica (carboidratos,

lípidos, proteínas saís e metabolitos secundários (Iriti et al., 2006). Os constituintes dos OEs são metabolitos secundários acumulados nestas estruturas que podem ser sintetizados nestas e/ou ao nível das células do mesófilo (Sudriá et al., 2001). Numa primeira fase secretora, os OE encontram-se armazenados no espaço subcuticular das células glandulares dos tricomas secretores em amadurecimento. Observa-se a seguir uma fase pós-secretora durante a qual os óleos são libertados após ruptura da cutícula (Sudriá et al., 1999).

Por seu lado, as espécies de Apiaceae são caracterizadas pela presença de ductos secretores de OE localizados em diversos órgãos das plantas (frutos, caules, folhas, pecíolos, etc.). No caso do funcho, verifica-se que podem existir ductos no parênquima medular, na proximidade dos tecidos vasculares e ainda ductos de maior calibre entre o floema e nos feixos de fibras do esclerênquima (Sousa et al., 2005). Sabe-se igualmente que a fase reprodutiva desta planta é acompanhada de uma redução indirecta do OEs, justificada provavelmente pela diminuição que se constata, ao longo de toda a planta, no número de ductos secretores (Sousa et al., 2005). Assim, parece evidente que a existência, abundância e distribuição destas estruturas esteja directamente relacionada com a ontogenia das plantas (Sangwan et al., 2001; Sousa et al., 2005). Estudos *in vitro* têm vindo a demonstrar a importância que os fitoreguladores poderão ter na estimulação/inibição da diferenciação e maturação das estruturas acumuladoras de OEs, nomeadamente nas glândulas de *Lavandula* sp. (Sudriá et al., 1999) e nos ductos secretores de *Foeniculum vulgare* (Paupardin et al., 1980).

A existência de estruturas acumuladoras é determinante para a sobrevivência das plantas devido a citotoxicidade que estes compostos apresentam (Bramley, 1995). Este facto permite-nos compreender melhor as razões associadas a ausência de acumulação de monoterpenos em meio de cultura de tecidos indiferenciados e células em suspensão observada em muitas espécies, designadamente *L. angustifolia* (Banthorpe et al., 1986) e *F. vulgare* (Paupardin, 1976).

1.2.3. Caracterização dos OEs

O estudo da composição dos OEs é um passo indispensável quando se pretende desvendar a natureza das fragrâncias de PAM. A análise dos compostos presentes nos OE é igualmente útil para adquirir conhecimento sobre a própria biogénese destes e estabelecer relações quimiotaxonómicas (Koedam, 1987). Além da caracterização qualitativa dos OEs, a quantificação dos seus componentes pode revelar-se de extrema importância quando se pretende distinguir diferentes óleos quanto à origem

e qualidade. Por outro lado, um estudo dos perfis fitoquímicos dos OEs produzidos em diferentes condições pode ajudar a elucidar alguns aspectos relacionados com a biossíntese e acumulação de constituintes dos OEs e, por conseguinte, explorar o metabolismo secundário associado a este tipo de compostos.

O processo de destilação (hidrodestilação ou arrastamento por vapor) é um método de extracção por excelência que permite recolher um extracto ao qual se dá exclusivamente a designação de OE (à excepção da expressão do epicarpo de frutos do género *Citrus*) (da Cunha *et al.*, 2007). Estes métodos de hidrodestilação são aplicados para extracção e recolha dos OEs da maioria das plantas aromáticas. A simplicidade do processo, usado tradicionalmente há já alguns séculos, contribuiu para a aplicabilidade deste até aos nossos dias, tanto na indústria como na investigação. Embora existam algumas limitações relacionadas com a natureza dos compostos voláteis existentes em certas plantas, este método permite, na maioria das vezes, uma recolha eficaz da componente volátil. Actualmente, têm-se desenvolvido esforços para a criação de métodos eficientes, rápidos, económicos e mais ecológicos (Chemat *et al.*, 2006).

A caracterização da composição dos OEs e definição dos teores normalmente aceitáveis serve de base para um melhor controlo de qualidade, sendo de extrema relevância para a valorização das espécies e comercialização dos seus OEs especialmente quando estes têm fins medicinais. Contudo, uma aplicação de tais critérios de composição mais rígidos pode constituir uma dificuldade em termos práticos especialmente para os produtores de plantas aromáticas. As informações decorrentes de investigação têm vindo a comprovar o quanto a composição química de óleos é inconstante. A variação dos teores dos constituintes pode revelar-se muito significativas em consequência de diversos factores associados às variedades e quimiótipos, ao tipo de cultivo, ao momento da colheita do material e ao processamento deste (Sangwan *et al.*, 2001).

1.2.3.1. Os constituintes terpenóides em *L. angustifolia*

Os terpenóides mais voláteis, isto é, tanto os os monoterpenos, sesquiterpenos e seus derivados oxigenados, podem ser facilmente separados por processos de destilação. No caso particular da alfazema, a extracção do OE é muito facilitada devido à localização exterior dos tricomas secretores. A água em ebulição atravessa as paredes das estruturas secretoras que encerram os óleos provocando um arrastamento gradual da componente volátil (Koedam, 1987).

O caso específico da *L. angustifolia* é um exemplo típico de como a destilação tradicional tem sido aplicada industrialmente. O isolamento e a caracterização dos OEs de alfavema de elevada qualidade têm sido objecto de estudo por parte dos laboratórios de investigação. Alguns dos varios estudos realizados para os OEs de *L. angustifolia* estão reunidos na tabela 1. O OE de *L. angustifolia* é maioritariamente constituído por compostos terpenóides, embora os perfis possam ser mais ou menos variáveis dependendo das espécies, variedades e quimiótipos. Porém, nos casos da alfavema comum e do lavandin, as espécies mais cultivadas para produção de óleo, estão definidas as gamas de valores expectáveis. A Organização Internacional para a Estandardização (ISO) recomenda teores de acetato de linalilo entre 38% e 58% e valores residuais de 1,8-cineole e cânfora, enquanto para o lavandin estes dois últimos são aceites em percentagens entre 7 e 8% (Lis-Balchin, 2002). Relativamente aos restantes compostos, a variabilidade é enorme, embora alguns constituintes mais frequentes possam ser referidos. Assim é o caso do linalool, do 1,8-cineole, da cânfora, do borneol, do terpinen-4-ol, da fenchona, do cariofileno e de vários ésteres como o acetato de lavandulilo, acetato de bornilo e acetato de geranilo (Kim e Lee, 2002; Chatzopoulou e Goliaris, 2003; Chemat *et al.*, 2006) (figura 6). Por seu lado, os OEs extraídos de folhas são normalmente constituídos por elevados teores de pinenos, 1,8-cineole, cânfora, borneol e diversos sequiterpenos (Hajhashemi *et al.*, 2003; Yusufoğlu *et al.*, 2004).

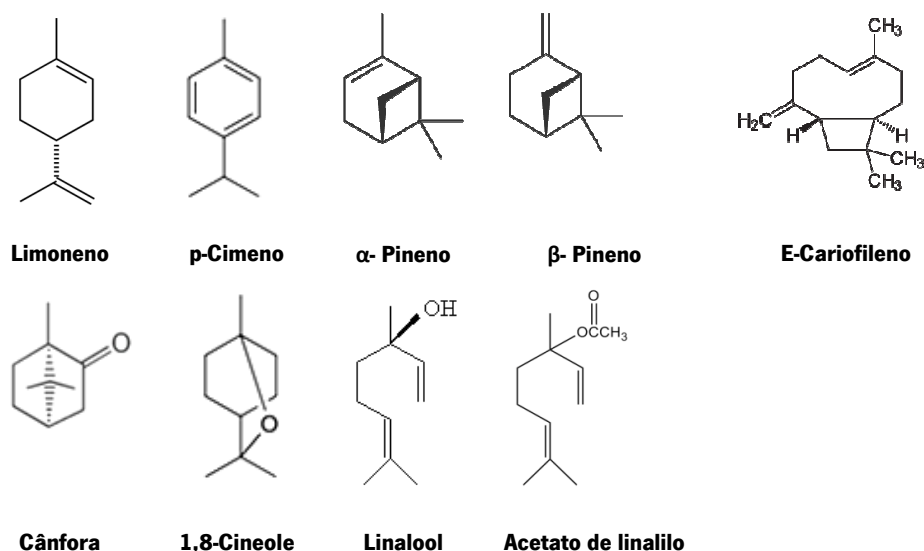


Figura 6. Representação das estruturas moleculares de alguns terpenóides mais comuns presentes nos óleos essenciais de *Lavandula angustifolia*. Acima estão colocados quatro hidrocarbonetos monoterpénicos (dois monocíclicos e dois bicíclicos) e um hidrocarboneto sesquiterpénico. Abaixo encontram-se monoterpénos oxigenados cíclicos e acíclicos.

Tabela 1. Seleção limitada de alguns estudos fitoquímicos desenvolvidos por diversos autores relativamente aos óleos essenciais de flores de *L. angustifolia*, aplicando o processo de destilação como método de extracção.

Tipologia	Método de extracção	Constituintes maioritários			País	Referências
Flores jovens	HD ¹	35% Linalool	12% Acetato de linalilo	8% Cânfora	Itália	(Reverchon e DellaPorta, 1995)
Flores	SDE ²	43% Linalool	14% α -terpinen-4-ol	8% 1,8-Cineole	Coreia	(Kim e Lee, 2002)
Flores	RPSD ³	37% Linalool	11% Borneol	10% α -terpinen-4-ol	Coreia	(Kim e Lee, 2002)
Partes aéreas	HD	35% Linalool	13% Acetato de linalilo	11% Acetato de lavandulilo	Irão	(Fakhari <i>et al.</i> , 2005)
Folhas	HD	65% 1,8-Cineole	12% Borneol	10% Cânfora	Irão	(Hajhashemi <i>et al.</i> , 2003)
Flores	SD ⁴	47% Linalool	12% Acetato de linalilo	10% Cânfora	Itália	(Chemat <i>et al.</i> , 2006)
Flores	HD	50% Linalool	11% Cânfora	8% Acetato de linalilo	Itália	(Iriti <i>et al.</i> , 2006)
Flores	MAHD ⁵	48% Linalool	12% Acetato de linalilo	11% Cânfora	Itália	(Iriti <i>et al.</i> , 2006)
Flores	MASD ⁶	44% Linalool	14% Acetato de linalilo	10% Cânfora	Itália	(Iriti <i>et al.</i> , 2006)

¹ HD: Hidrodestilação; ² SDE: Simultaneous steam distillation and solvent extraction; ³ RPSD: Reduced-pressure steam distillation; ⁴ SD: Steam distillation; ⁵ MAHD: microwave-assisted hydrodistillation; ⁶ MASD: Microwave Accelerated Steam Distillation.

1.2.3.2. Os fenilpropanóides em *F. vulgare*, *A. graveolens* e *P. crispum*

Como foi já referido, para além dos constituintes terpenóides, é comum encontrar nos OEs de algumas plantas compostos que derivam do fenilpropano. Distinguem-se como fenilpropanóides constituintes de OEs: o eugenol, o metil eugenol, a miristicina, o metil cinamato, a elemicina, o chavicol, o metil chavicol, o dillapiol, apiole, anetole e estragole, etc. (Sangwan *et al.*, 2001). Na grande maioria das plantas estes compostos são menos frequentes, porém, no caso dos OEs de Apiaceae a presença destes compostos é muito característica. Assim, um conjunto de compostos alilifenólicos e propenilfenólicos tal como o anisalaldeído, o anetole e/ou o apiole por exemplo, podem ser encontrados na planta do anis, do funcho, da salsa, etc. (da Cunha *et al.*, 2004). Contudo, este grupo de compostos existe igualmente em elevados teores em plantas pertencentes a outras famílias. Assim é no caso do estragão, da canela e do cravinho que são caracterizados pelos seus conteúdos em estragole, eugenol, e cinamilaldeído, respectivamente (da Cunha *et al.*, 2004). A maioria dos fenóis e éteres fenólicos derivam de um núcleo do *p*-cimeno ou do propilbenzeno. Esta última estrutura

fundamental, está na origem da maioria dos compostos presentes nos OEs (da Cunha *et al.*, 2007), como é o caso, inclusivamente, dos OEs de Apiaceae.

Na generalidade, o OE de *F. vulgare* var. *vulgare* é maioritariamente caracterizado pela presença de dois derivados de fenilpropanóides como constituintes maioritários: o anetole e o estragole (figura 7). Estes dois compostos são formados por metilação dos respectivos compostos anol e chavicol por intervenção de enzimas designadas *O*-metiltransferases (Gross *et al.*, 2002). Estas duplas de monofenóis, anetole/estragole e anol/cavicol, constituem conjuntos de isómeros propenílicos, diferindo somente na posição da dupla ligação localizada ao nível da cadeia propenil (Gross *et al.*, 2002).

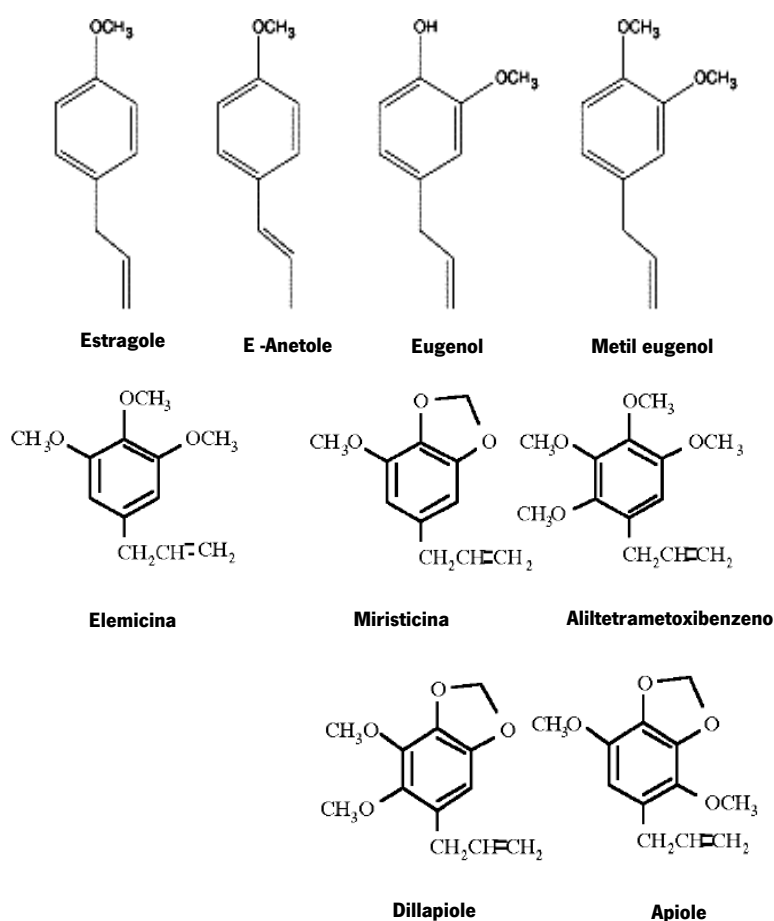


Figura 7: Representação estrutural de alguns fenilpropanóides. Exemplos de derivados de monofenóis, difenóis, trifenóis e tetrafenóis presentes nos óleos essenciais de Apiaceae, nomeadamente em *Foeniculum vulgare*, *Petroselinum crispum* e *Anethum graveolens* (da Cunha *et al.*, 2004 e 2007; Lamarti *et al.*, 1993a,b).

Em contrapartida, os compostos derivados de difenóis, não são muito específicos das espécies de Apiaceae incluídas neste estudo. Porém, distinguem-se alguns derivados de trifenóis (elemicina e miristicina) nestas espécies. A elemicina e a miristicina (figura 7) podem ser encontradas nas folhas de salsa, embora a elemicina seja minoritária e bem menos frequente (Simon e Quinn, 1988; Kurowska e Gałazka, 2006). A miristicina, por seu lado, tem sido apontada como um dos constituintes maioritários nos OEs de aneto (Lichtenstein *et al.*, 1974; Huopalahti e Linko, 1983).

Finalmente é de destacar a presença de derivados tetrafenólicos em teores consideráveis nos OEs de aneto e salsa. É o caso do apiol e dillapiol (figura 7) que podem ser encontrados, sós ou em simultâneo, nos OEs de partes aéreas de *A. graveolens* (Huopalahti e Linko, 1983). Por seu lado, o OE dos frutos de *P. crispum* é particularmente rico em apiol e por vezes 1-*alil*-2,3,4,5-tetrametoxibenzeno (figura 7), dependendo da variedade da planta (Kurowska e Gałazka, 2006; da Cunha *et al.*, 2007).

É importante referir que os OEs extraídos das raízes destas espécies de Apiaceae contêm igualmente derivados tetrafenólicos, como o apiol e dillapiol, em teores bem superiores relativamente às respectivas partes aéreas. O mesmo se tem vindo a verificar para a miristicina, um derivado trifenólico, que, embora igualmente detectado nas partes vegetativas e/ou frutos de aneto e salsa, se encontra mais abundantemente nas raízes de muitas espécies desta família (Lichtenstein *et al.*, 1974; Santos *et al.*, 2002; Petropoulos *et al.*, 2004).

1.3. Biotecnologia vegetal de *L. angustifolia*, *F. vulgare*, *A. graveolens* e *P. crispum*

A biotecnologia de plantas constitui, cada vez mais, um meio indispensável para o estudo e melhoramento de plantas de elevado valor, quer pela sua relevância ecológica, pela importância comercial como espécies de cultivo para consumo humano e/ou animal ou como fonte de metabolitos de interesse farmacêutico e agro-industrial. O estabelecimento de culturas, possibilita uma aplicação de técnicas mais avançadas, designadamente, engenharia genética envolvendo ou não transformação mediada por estirpes de *Agrobacterium*, imprescindíveis para explorar e caracterizar o metabolismo secundário contribuindo, desta forma, para o conhecimento científico fundamental da biologia das plantas. As culturas *in vitro* de plantas ou tecidos, representam uma via estratégica para a optimização da produção de determinado (s) metabolito (s) de interesse dessas mesmas plantas ou de outros organismos por engenharia metabólica.

No que diz respeito a espécies de *Lavandula* sp., a maioria das publicações de culturas *in vitro* têm incidido sobre o estabelecimento e crescimento de *callus*, explantes primários ou suspensões celulares. Estes trabalhos foram objecto de revisão por Segura e Calvo (1991). No caso particular de *L. angustifolia*, os estudos têm-se concentrado essencialmente em culturas de células em suspensão (Segura e Calvo, 1991). Porém, algumas técnicas de micropropagação de rebentos assim como a rizogénese e formação de tecidos por via directa ou indirecta (regeneração a partir de *calli*) já foram levadas a cabo (Andrade *et al.*, 1999; Tsuro *et al.*, 1999; Tsuro *et al.*, 2000). Mais recentemente, foi realizada a clonagem, identificação e caracterização de enzimas-chave da biossíntese de terpenóides em *L. angustifolia*, designadamente, duas sintetases de monoterpenos e uma sintetase de sesquiterpenos (Landmann *et al.*, 2007). Alguns estudos têm incidido sobre a aplicação de tecnologias de DNA recombinante e a obtenção de plantas transgénicas noutras espécies de *Lavandula* sp. (Dronne *et al.*, 1998; Dronne *et al.*, 1999; Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2006).

No caso do funcho, existe um número considerável de trabalhos publicados direccionados para a micropropagação de meristemas axilares, cultura de *callus*, embriogénese somática e posterior caracterização morfológica das plantas adultas (Hunault *et al.* 1989; Hunault e Du Manoir, 1992 e referências). A indução de *hairy roots* de funcho amargo por infecção com *Agrobacterium rhizogenes* foi também reportada (Brillanceau, 1986; Sugiura *et al.*, 1998).

No que diz respeito ao *Anethum graveolens*, encontram-se publicações relativas a diversos estudos *in vitro* realizados entre as décadas de 60 a 80. Alguns trabalhos iniciados com explantes de tecidos diferenciados (coltilédones, hipocótilos, inflorescências, ovários) permitiram a obtenção de *calli* e embriões. A regeneração de rebentos a partir de culturas de *calli* foi também reportada (Everitt e Lockwood, 1995 e referências). Everitt e Lockwood (1995) determinaram os efeitos de uma série de factores (pH, da luz, temperatura, adição de açúcar, adição antioxidante, incorporação de precursores) no crescimento e desenvolvimento de *callus*. Por outro lado, Banthorpe e seus colaboradores (1986) recorreram as culturas de *calli* de aneto como material de estudo para o isolamento de enzimas da via do Mevalonato. Relativamente á transformação de tecidos, já foi descrita a indução de *hairy roots* por infecção com *A. rhizogenes* (Santos *et al.*, 2002).

Por último, é de referir que os estudos *in vitro* de salsa são certamente os mais escassos, datando igualmente dos anos 60 a 80. Os trabalhos desenvolvidos nessas décadas, descrevem a obtenção de tecidos indiferenciados e posterior regeneração de plantas por embriogénese somática (Vasil e Hildebrandt, 1966; Masuda *et al.*, 1977). Só mais recentemente, foi divulgado um trabalho de micropropagação de *shoots* com enraizamento e aclimação das plantas, recorrendo a rosetas de plantas mãe *in vivo* (Vandemoortele *et al.*, 1996).

1.3.1. Estudos fitoquímicos de culturas *in vitro* e optimização da produção

Diversos estudos têm sido levados a cabo com culturas *in vitro* de *L. angustifolia* no intuito de caracterizar metabolitos secundários e otimizar a produção destes. Porém, as publicações sobre a acumulação e produção de constituintes de OEs por plantas *in vitro* são bastante escassas. Suspensões de células de *L. angustifolia* foram já utilizadas para a biotransformação de monoterpenos (Lappin *et al.*, 1987). Contudo, esta tentativa não foi bem sucedida tendo sido evidenciada apenas a capacidade catabólica das células. Posteriormente, recorrendo já a tecidos indiferenciados (*callus*), foi conseguida a estimulação da produção de alguns terpenóides (Banthorpe *et al.*, 1995). Neste contexto, é importante referir que a obtenção de plantas transgénicas de outra espécie de *Lavandula* (*L. Latifolia*) revelou-se uma estratégia de sucesso para a produção de OE (Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2006). A inserção de cDNA da enzima que catalisa o primeiro passo da via biossintética de monoterpenos, a 1-Deoxi-D-xilulose-5-P sintase (DXS), permitiu obter uma expressão constitutiva deste transgene, induzindo uma acumulação significativa de OE nas folhas e nas flores desta espécie (Muñoz-Bertomeu *et al.*,

2006). Apesar de tudo, o estudo fitoquímico de suspensões de *Lavandula angustifolia* tem permitido um isolamento e identificação de uma variedade de compostos. Destaca-se, por exemplo, a produção de ácidos gordos como o ácido palmítico (54.2%), oléico (23.4%), nonanedióico (7.2%), esteárico (3.9%), α -linolénico (2.7%) e mirístico (2.2%) (Topçu *et al.*, 2007). Por outro lado, a produção de pigmentos azuis por suspensões de *L. angustifolia* têm sido igualmente objecto de estudo (Banthorpe *et al.*, 1985; Nakajima *et al.*, 1985). Nesta situação em particular, a imobilização de células revelou-se muito eficaz no prolongamento do período de produção deste pigmento (Nakajima *et al.*, 1985). Por fim, é de mencionar a capacidade das culturas de células de *L. angustifolia* (sin. *L. vera*) têm vindo a revelar relativamente à produção de ácido rosmarínico. Numa série de estudos de optimização, um grupo de investigadores foi desvendando os efeitos de diversos factores na produção e acumulação deste composto fenólico antioxidante. A produção foi sendo progressivamente melhorada (69 mg/l no cultivo em balão para 3,5 g/l em bioreactores) por adição de um teor elevado de açúcar (7%) (Ilieva e Pavlov, 1997) por variação de constituintes do meio de cultura (Pavlov *et al.*, 2000), acréscimo de temperatura (Georgiev *et al.*, 2004) e aumento da concentração de oxigénio dissolvido no meio (Pavlov *et al.*, 2005). Para além disso, outros autores relacionaram o efeito do stress (anóxia) nas suspensões de *Lavandula officinalis* com o aumento da acumulação de outros constituintes (fenóis, flavonóides, antraquinonas, taninos, alcalóides e saponinas) (Nitzsche *et al.*, 2004).

À semelhança de *L. angustifolia*, a escassez de estudos de caracterização de OEs produzidos *in vitro* pelas espécies de Apiaceae em estudo é notória. A informação mais recente disponível referente à componente volátil de plantas ou tecidos *in vitro* para o funcho, aneto e salsa, respectivamente, é efectivamente muito escassa (Lamarti *et al.*, 1993a; Santos *et al.*, 2002; López *et al.*, 1999). Sabe-se que existem mais estudos nessa mesma área, designadamente para o funcho e o aneto, não sendo de fácil acesso (teses de doutoramento ou publicações dos anos 70 e 80).

As culturas *in vitro* de plântulas de funcho amargo (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*) foram caracterizadas por Lamarti *et al.* (1993a) quanto ao seu conteúdo em constituintes dos OEs. Estes verificaram a abundância de arilpropenos (éteres fenólicos) *in vitro* devido essencialmente ao dillapiol (56%) e ao *trans*-anetole (12 %), revelando uma composição muito distinta de partes aéreas e frutos *in vivo* (Lamarti *et al.*, 1993a). A produção *in vitro* de metabolitos secundários por suspensões celulares de funcho foi já alvo de estudo, tendo sido demonstrada, mais uma vez, a reduzida capacidade de células isoladas em produzir compostos aromáticos. Mesmo recorrendo a um precursor biossintético dos fenilpropanóides (a fenilalanina), não foi possível induzir a produção de *trans*-anetole, embora,

fossem encontrados teores residuais de outros compostos (eugenol, álcool benzílico, feniletanol e anisaldeído) (Hulnaut *et al.*, 1989). Anteriormente, Paupardin e seus colaboradores (1980), já haviam afirmado que a biossíntese de óleo *in vitro* implicava a organogénese prévia das estruturas secretoras. De facto, só se tinha conseguido produção de alguns compostos, incluindo o próprio anetole, em culturas de *calli* que suportavam estruturas diferenciadas, designadamente rebentos caulinares (Paupardin, 1976; Paupardin *et al.*, 1980). Os autores constataram o efeito da suplementação hormonal (NAA e BA) no rendimento em OE e relacionaram-no com o efeito estimulador ou inibidor da auxina na diferenciação dos canais secretores (Paupardin *et al.*, 1980).

Os estudos com culturas *in vitro* de *Anethum graveolens* também carecem de abordagens fitoquímicas dos respectivos OEs produzidos em tais condições. Num estudo realizado com suspensões celulares de aneto, verificou-se que estas não exibiam qualquer capacidade de conversão de IPP marcado radioactivamente em terpenóides ou hidrocarbonetos voláteis (Everitt e Lockwood, 1995). A produção de OE por *hairy roots* de *A. graveolens* já foi, porém, objecto de estudo (Santos *et al.*, 2002). Apesar do baixo rendimento em OE, os autores constataram uma produção muito acentuada de constituintes do grupo dos fenilpropanóides por raízes transformadas (62%) relativamente a raízes *in vivo* não transformadas (15%) desta espécie (Santos *et al.*, 2002). Acerca da produção de compostos voláteis por suspensões celulares de aneto, destaca-se o trabalho de Everitt e Lockwood (1995) em que se reporta a conversão de geraniol em nerol.

Por último, refere-se o estudo fitoquímico de ácidos gordos e constituintes voláteis por culturas *in vitro* de *Petroselinum crispum* ao longo dos ciclos de crescimento de plântulas, *calli* e suspensões celulares (López *et al.*, 1999). As plântulas de salsa revelaram um predomínio na produção de monoterpenos, em especial, de 1,3,8-*p*-mentatrieno e β -felandreno. Para além destes compostos, destacou-se a produção de apiole e miristicina. Por seu lado, as culturas de *calli* e suspensões celulares, exibiram, ao longo do tempo, uma reduzida produção de voláteis (aldeídos e alguns terpenos). Este trabalho destaca-se igualmente pela caracterização de ácidos gordos (ácido palmítico e esteárico) produzidos nos três tipos de culturas, uma abordagem que, segundo os autores, ainda não havia sido desenvolvida para esta espécie (López *et al.*, 1999). Para além dos ácidos gordos saturados, os autores detectaram diversos ácidos gordos insaturados em plântulas de salsa (C16:1, C16:3, C18:2 e C18:3) ao contrário das culturas de *calli* e suspensões celulares.

1.4. Bio - insecticidas

O controlo de insectos constitui um dos grandes problemas da humanidade. Milhares de espécies apresentam um severo impacto na saúde humana, sendo considerados nocivos para o homem. De um modo mais geral, o conceito de peste é atribuído a inúmeras espécies de artrópodes. São os casos dos parasitas de humanos e animais domésticos (caraças, pulgas, piolhos, etc.), os vectores de doenças (mosquitos, moscas, etc.), os destruidores de estruturas (térmitas) e as pragas agrícolas (gafanhotos, coleópteros, lagartas, etc.). Os insectos vectores de agentes patogénicos estão envolvidos na propagação de doenças graves que provocam a morte ou sintomas crónicas em milhões de pessoas todos os anos (malária, Dengue e Dengue hemorrágica, febre-amarela, doença de Chagas, etc.). Alguns insectos representam, ao nível da transmissão de doenças, verdadeiros flagelos enquanto outros constituem importantes pestes no domínio agrícola (Regnault-Roger, 1997). Neste último caso, identifica-se uma panóplia de insectos fitófagos e/ou fitoparasitas causadores de danos e perdas significativos das culturas. A acção destes pode ser directa ou indirecta desde a fase de cultivo à de armazenamento. Assim, todas estas pestes constituem alvos preferenciais no que toca ao desenvolvimento de estratégias de combate, nomeadamente agentes de controlo biológico.

Como já é do conhecimento geral, a utilização desmesurada de insecticidas sintéticos tem-se revelado muito problemática em termos de saúde humana e ambiental, essencialmente devido à persistência destes no meio ambiente e aos efeitos colaterais nos organismos não visados. Para além disso, a progressão de resistências nos insectos alvo tem levado à restrição progressiva da aplicação destes e/ou introdução de novos compostos sintéticos (Shaaya e Rafaeli, 2007). Em consequência, enquanto o número de compostos disponíveis no mercado têm vindo a ser reduzidos, assiste-se a um aumento da procura de compostos de origem natural menos nocivos para o ambiente (Shaaya e Rafaeli, 2007). Estas exigências do mercado, em conjunto com as pressões exercidas a nível internacional em termos de legislação, têm estimulado o desenvolvimento de alternativas mais seguras. Nos últimos anos, os esforços nesta área têm sido consideráveis. Neste contexto de pesquisa de novos bio-insecticidas, os extractos provenientes de plantas têm recebido uma atenção especial. De entre os grupos de compostos candidatos com maior potencial encontram-se os constituintes voláteis dos OEs (Shaaya e Rafaeli, 2007). Adicionalmente, uma série de novos compostos têm sido identificados, servindo de base para o desenvolvimento de novos produtos. Embora neste trabalho se pretenda

efectuar uma abordagem direccionada para os bio-insecticidas de origem vegetal, é importante relembrar que parte das pesquisas se direcciona também para outras estratégias de controlo biológico de insectos. Assim, um bio-insecticida pode corresponder a muito mais do que compostos produzidos a partir de fontes naturais facilmente eliminados pela natureza. Alguns organismos vivos (bactérias, fungos, predadores, parasitas) podem ser considerados agentes de controlo de insectos e em último recurso insecticidas, podendo ser parte integrante de uma estratégia de controlo. Em determinados contextos, o recurso a predadores, parasitas, microrganismos ou toxinas produzidas por estes últimos, constituem abordagens bem sucedidas (World Health Organization, 1996). Um caso exemplificativo de um bio-pesticida de origem microbiana é o *spinosad*. Este composto, criado a partir de dois macrolidos tetracíclicos (spinosina A e D) produzidos por fermentação pelo fungo actinomiceta *Saccharopolyspora spinosa*, tem-se revelado extremamente tóxico contra lepidópteros, dípteros e coleópteros (Bond *et al.* 2004).

Porém, o uso de bio-insecticidas acarreta algumas desvantagens essencialmente devido à maior lentidão de actuação e menor persistência no tempo. Todavia, estas limitações constituem um desafio certamente superável se recorrermos a tecnologias que protejam os compostos bio-activos da degradação (como veremos mais adiante). Por outro lado, é importante reforçar a ideia de que a diversificação de métodos no controlo de insectos é uma abordagem mais sustentável a longo prazo. A combinação simultânea ou alternada de vários métodos deverá contribuir para a redução dos efeitos indesejáveis, acumulação de químicos e desenvolvimento de resistências (Regnault-Roger, 1997).

1.4.1. O desenvolvimento dos bio-insecticidas de origem vegetal

Uma das estratégias mais promissoras envolve um controlo fitoquímico de insectos indesejáveis baseado nas relações de defesa que se desenvolvem na natureza como resultado de uma co-evolução entre plantas e insectos (Mello e Silva-Filho, 2002). Estes medidores químicos exercem importantes efeitos no comportamento dos insectos podendo atrair os polinizadores ou repelir insectos, dissuadir os parasitas e fitófagos de ingerir as plantas quer através da fraca palatabilidade ou por inibição da digestão. Por outro lado, estes podem ter efeitos estimuladores ou inibidores na reprodução dos insectos (Regnault-Roger, 1997). Neste domínio, os compostos aromáticos exibem um papel

particularmente eficiente como aleloquímicos, devido essencialmente às suas características físicas e ao seu baixo peso molecular.

Actualmente, é possível constatar que alguns compostos vegetais com efeitos insecticidas já têm vindo a entrar na concepção de algumas formulações. Os insecticidas naturais como a rotenona (*Derris elliptica*), o piretro (*Tanacetum cinerariifolium*), a nicotina (*Nicotiana tabacum*) e os limonóides (*Azadirachta indica*) têm sido extensivamente usados (figura 8). Porém, em muitos casos, o que se verifica é a incorporação de análogos e derivados de compostos naturais como substitutos destes (Peterson e Coats, 2001). O caso mais ilustrativo é o dos piretróides cujo sucesso comercial se deveu efectivamente a uma síntese química de moléculas mais fotoestáveis. Desde 1970, o desenvolvimento de derivados sintéticos baseados na piretrina I (figura 8), proveniente de *Tanacetum cinerariifolium*, deu lugar a uma geração de produtos (Alletrina, Permetrina, Deltametrina, etc.), em pouco ou nada semelhantes à molécula original (Isman e Akhtar, 2007; Khambay, 2002). Paralelamente, foi-se assistindo ao desenvolvimento de resistências em muito insectos, nomeadamente em mosquitos, devido a resistências cruzadas de populações resistentes a insecticidas químicos mais antigos como o DDT, os carbamatos, etc. ou aos diferentes piretróides (World Health Organization, 1996).

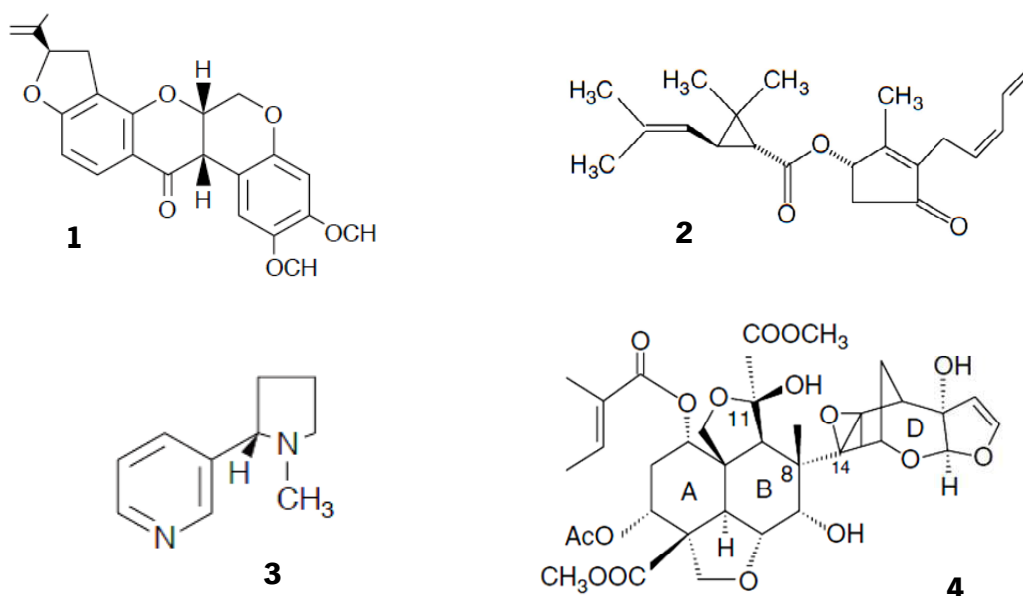


Figura 8. Representação estrutural de diversos compostos de origem vegetal com actividades anti-insecto. 1- Rotenona (*Derris elliptica*); 2- Piretrina I (*Tanacetum cinerariifolium*); 3- Nicotina (*Nicotiana tabacum*); 4 - Azadiractina (*Azadirachta indica*). Figuras extraídas do livro: *Insecticides Design Using Advanced Technologies*. Eds: Ishaaya I., Nauen R. and Horowitz A.R. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007.

A diminuição da sensibilidade a vários piretróides e outros insecticidas já foi reportada para os mosquitos *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, no Oeste da África na Indonésia e em vários países, respectivamente (World Health Organization, 1996).

Embora algumas centenas de compostos vegetais tenham já demonstrado alguma bio-actividade em um ou mais do que um insecto em contexto laboratorial, os efeitos *antifeedant* ou inibitórios do crescimento são muito mais comuns do que um efeito letal. Esta constatação serve, de algum modo, para compreender melhor o facto de somente um número reduzido de compostos serem efectivamente comercializados em países industrializados (Isman, 2006). Na realidade, dos milhares de extractos avaliados, muito poucos apresentaram uma toxicidade satisfatória.

Nos últimos vinte anos, a árvore do Neem (*Azadirachta indica*) especialmente o seu fruto, tem sido sujeito a uma intensa avaliação pelos seus limonóides triterpénicos. Até à data, a azadiractina, o limonóide mais activo de *A. indica* (Meliaceae), representa um dos compostos insecticidas mais potentes de entre os que têm vindo a ser testados (Isman e Akhtar, 2007). Este composto tem revelado uma acção *antifeedant* muito acentuada. Por outro lado, a sua interacção ao nível do sistema neuro-endócrino parece afectar os níveis de hormonas envolvidas nas mudas dos insectos (ecdisteróide e hormona juvenil) resultando em limitações severas do crescimento e até mesmo no aparecimento de aberrações. Adicionalmente, a azadiractina tem demonstrado efeitos negativos na maioria dos tecidos dos insectos (Aerts e Mordue, 1997). Até ao momento, a única forma de comercializar o composto é recorrendo à extracção a partir das sementes. No entanto, esta prática tem um elevado custo associado pois a complexidade da molécula ainda não permitiu uma síntese completa desta (figura 8).

Distinguem-se igualmente outros grupos de compostos com actividade tóxica comprovada. O género *Aglaia*, também pertencente à família Meliaceae tem atraído as atenções como uma fonte de produtos únicos incluindo o grupo das rocaglamidas (Isman e Akhtar, 2007). Alguns destes derivados de rocaglamidas revelaram uma forte actividade insecticida em *Spodoptera littoralis* atribuído à presença de um esqueleto de ciclopentatetrahidrobenzofurano (Nugroho *et al.*, 1999). Por outro lado, em várias espécies da família Annonaceae foram identificados nas sementes, frutos e cascas das árvores, mais de quatrocentas moléculas complexas: as acetogeninas. Alguns destes compostos revelaram um mecanismo de acção semelhante à rotenona. Embora algumas destas substâncias tenham servido de base para o desenvolvimento de patentes, a sua utilização comercial não foi muito longe devido essencialmente à reduzida especificidade do modo de acção e o alvo celular em questão

existente também nos mamíferos e outros animais, o complexo I da cadeia respiratória (NADH: Ubiquinona oxidoreductase) (Isman e Akhtar, 2007). Por último destacam-se também os compostos alcalóides extraídos de espécies da família Stemonaceae, com setenta derivados caracterizados, e as naptoquinonas, produzidas por plantas pertencentes à família Scrophulariaceae (Khambay *et al.*, 1997; Isman e Akhtar, 2007).

1.4.1.1. Fragrâncias vegetais como estratégia bioracional no controlo de insectos

As actividades insecticidas ou insecto-repelente dos constituintes presentes nos OEs são reconhecidas desde muito tempo. Apesar da utilidade destes já ter sido comprovada, a comercialização de OEs para esse efeito é, todavia, ainda muito recente (Isman e Akhtar, 2007). Este grupo de compostos tem sido considerado uma grande aposta, sendo-lhes atribuído um elevado potencial neste domínio dos bio-insecticidas. A relativa simplicidade química, a familiarização do mercado aos constituintes aromáticos em conjunto com o carácter menos tóxico destes compostos são alguns dos aspectos que muito contribuem para a grande receptividade a esta classe de compostos vegetais e sua integração num controlo bioracional de insectos. Porém, o aspecto mais relevante está relacionado com as recentes evidências de que estes exibem um modo de acção mais selectivo para os insectos e menos tóxico para os mamíferos (Isman e Akhtar, 2007; Shaaya e Rafaeli, 2007). Para além disso, alguns compostos demonstraram uma elevada eficiência e uma certa abrangência no tipo de actividades anti-insectos exibidas (Regnault-Roger, 1997). De facto, estes constituintes dos OEs podem actuar sobre as várias fases de desenvolvimento dos insectos, desde a larva ao adulto, interferindo inclusive na reprodução destes (Regnault-Roger, 1997). Assim, os OEs ou compostos voláteis isolados podem ser usados como fumigantes, dissuasores de fitofagia (*antifeedant*), repelentes e tóxicos de contacto por meio de aplicação tópica (Regnault-Roger, 1997). Os monoterpenóides em particular, exercem um efeito neurotóxico em insectos à custa, no entanto, de doses significativamente maiores que os insecticidas convencionais (Isman e Akhtar, 2007).

No âmbito das aplicações industriais ou privadas (preservação do interior das casas livre de insectos e outros artrópodes), a comercialização de produtos de OEs contendo o óleo ou alguns constituintes têm vindo a ser concretizada. Hoje em dia, os OEs são essencialmente aplicados na

protecção dos animais domésticos, nas roupas contra as traças e como protectores de madeiras (Peterson e Coats, 2001). Estes podem ser incorporados em formulações contendo igualmente os piretróides ou os inibidores do crescimento (Peterson e Coats, 2001). Por outro lado, estes compostos voláteis representam uma alternativa ecológica muito promissora na substituição dos fumegantes tóxicos mais usados até à data como a fosfina e brometo de metilo (PH_3 e CH_3Br) no controlo de pestes das colheitas agrícolas armazenadas (Shaaya e Rafaeli, 2007). A concepção/comercialização de alguns produtos contendo OEs tem-se evidenciado cada vez mais. Alguns repelentes comerciais como o *Buzz Away*® e o *Green Bar*®, ambos contendo OEs (citronela, óleos de cedro, eucalipto e limonete ou OE de alfavaca, sassafrás, menta e bergamota, respectivamente) já se encontram à venda (Peterson e Coats, 2001).

Dada a relativa baixa toxicidade exibida nos vertebrados, a grande maioria dos compostos terpenóides e fenóis encontrados nos OEs têm sido considerados como geralmente seguros para a saúde (GRAS) pela *Food and Drugs Administration* (FDA) nos Estados-Unidos (Kostyukovsky *et al.*, 2002). Embora pouco se saiba ainda sobre os mecanismos de acção envolvidos nas diversas actividades atribuídas até então aos constituintes dos OEs (Regnault-Roger, 1997), alguns avanços recentes contribuíram, de forma muito significativa, para o esclarecimento desta questão (Evans e Robb, 1993; Kostyukovsky *et al.*, 2002; Nauen e Bretschneider, 2002). A seguir é apresentada uma descrição dos tipos de actividade anti-insecto, alguns dos conhecimentos inerentes aos possíveis modos de acção de diversos insecticidas e uma descrição mais concreta de plantas e extractos reconhecidos pela sua actividade, procurando enquadrar igualmente as espécies vegetais em estudo neste trabalho.

1.4.2. Actividades anti-insecto

Como já foi referido, as actividades de plantas ou extractos vegetais nos insectos podem ser variáveis tendo em conta as diferentes manifestações comportamentais destes últimos. Porém, a observação da resposta dos insectos nem sempre ajuda a discriminar entre os vários tipos de actividade. Por exemplo, são vários os motivos que poderão dissuadir um insecto fitófago a não se alimentar a partir de determinada planta. Esta poderá simplesmente causar repelência no insecto, por

libertação de moléculas voláteis, acumular substâncias desagradáveis ao paladar ou ainda ser tóxico após a ingestão, causando complicações da digestão e stress fisiológico (Regnault-Roger, 1997).

Por outro lado, verifica-se uma enorme variabilidade de respostas aos produtos, entre diversas espécies de insectos. De facto, alguns estudos demonstram que pode existir uma susceptibilidade diferente dos insectos a determinada substância ou extracto (Amer e Mehlhorm, 2006; Enam, 2001). Relativamente a esta problemática, pode afirmar-se que a multiplicidade de efeitos numa grande variedade de insectos é uma característica rara e que normalmente uma grande maioria dos extractos vegetais apresenta espectros de actividade muito distintos. Por enquanto, somente os produtos extraídos da árvore do Neem (*A. indica*) exibiram tal potencial. O seu leque de actividades pode abranger desde o desenvolvimento, a fecundidade, a fisiologia, até aos comportamentos dos insectos (Mulla e Su, 1999).

Em termos de actividade, é possível avaliar *in vivo* ou em laboratório vários efeitos anti-insectos. Em laboratório é comum a realização de diversos ensaios incluindo os vários estados de desenvolvimento dos insectos, tais como ensaios ovicidas, de inibição da oviposição, larvicidas, *antifeedant*, de repelência ou os ensaios de toxicidade das formas adultas por vapor ou contacto (Kubo, 1991); Prajapati *et al.*, 2005). Para além desta diversidade de actividades anti-insecto, a variabilidade de resultados positivos têm sido atribuída a muitas classes de compostos vegetais, de forma que se torna impossível abordar todas elas. Assim, tendo em conta o âmbito deste trabalho, direccionar-se-á a atenção para a actividade dos OEs, abordando os diversos aspectos relacionados com os possíveis modos de acção e alguns resultados publicados.

Até à data, os mecanismos tóxicos de actividade dos OEs ainda não estão totalmente elucidados. A teoria de um modo de acção neurotóxico tem vindo a ser reforçada com base nos sintomas de hiperactividade, convulsões, tremores e paralisia, revelados em tratamentos com OEs (Shaaya e Rafaeli, 2007). Na toxicidade destes deverão estar envolvidos muitos factores para além da variabilidade estrutural dos compostos. A via de contacto é um dos aspectos considerados mais relevantes. Os OEs podem entrar em contacto por via atmosférica, serem inalados e entrar no sistema respiratório, podem ser ingeridos e actuar a partir do sistema digestivo ou serem absorvidos pela pele por contacto directo (Shaaya e Rafaeli, 2007; Regnault-Roger, 1997). Porém, nem todas estas vias ocorrem simultaneamente num tipo de insecto alvo. Por outro lado, a susceptibilidade a um determinado OE ou composto purificado é extraordinariamente variável. No caso de alguns insectos, a co-evolução com algumas plantas conferiu-lhes protecção adicional contra as mesmas através de

processos de inactivação e/ou desintoxicação desses químicos (Shaaya e Rafaeli, 2007). Neste domínio, uma avaliação prévia dos espectros de acção é fundamental para determinar o potencial comercial e otimizar o tipo de formulação. Porém, tal só é possível se existir uma compreensão razoável dos modos de acção. A seguir, encontra-se uma descrição dos possíveis modos de acção dos OEs, referindo igualmente os mecanismos mais conhecidos associados aos insecticidas de síntese.

1.4.2.1. Modos de acção de insecticidas

O sistema nervoso dos insectos, nomeadamente a sinalização nervosa, tem sido apontado como o alvo mais provável dos OEs. Até à data, reconhecem-se várias formas de actuação atribuídas aos insecticidas de síntese comercializados.

Como é possível constatar na tabela 2, no mercado dos insecticidas existe uma elevada prevalência dos inibidores da acetilcolinaesterase (AChE), a enzima responsável pela clivagem do neurotransmissor acetilcolina. Para além destes, destacam-se os compostos que interferem ao nível dos canais de sódio (VgSch) envolvidos na polarização e despolarização das células nervosas e propagação dos potenciais de acção. Segundo Nauen e Bretschneider (2002), ambos os tipos de insecticidas constituíam, há uma década atrás, cerca de 70% do mercado mundial.

Tabela 2. Modos de acção dos 100 insecticidas/acaricidas mais vendidos, percentagens de vendas no ano 1999 e exemplos de compostos comercializados

Modos de acção	% Vendas	Exemplos
Acetilcolinaesterase	52	Carbamatos e organofosfatos
Canais de Sódio	18	DDT, Piretróides, Isobutilamidas
Receptores da acetilcolina	12	Neonicotinóides, <i>Spinosad</i> (agonistas)
GABA receptores/Canais de Cloro	8,3	Arilamino-pirazol, <i>Dieldrin</i>
Biossíntese da quitina	3,0	Benzoilfenilureas
NADH desidrogenase	1,2	Rotenona, Piericidinas
Desacopladores	0,7	Dinitrofenóis, <i>Chlofenapyr</i>
Receptores octopamina	0,6	Óleos essenciais
Receptores Ecdisona	0,4	Tebufenozide, metoxifenozone, halofenozone

Nota: Tabela modificada, criada a partir da publicação de Nauen e Bretschneider, 2002.

Os modos de actuação dos insecticidas sintéticos são de facto muito diversos. Para além dos referidos acima, outras classes de compostos podem interferir a diferentes níveis do sistema nervoso. Alguns compostos podem actuar como ligandos de receptores, desempenhando o papel de agonistas dos receptores acetilcolina nicotínicos (nAChRs), localizados no sistema nervoso central dos insectos. Por outro lado, referem-se os compostos antagonistas que actuam ao nível dos receptores do ácido γ -aminobutírico (GABA), situados no sistema nervoso central e periférico dos insectos (Nauen e Bretschneider, 2002). Um outro tipo de insecticidas tem uma actividade centrada na respiração celular ao nível da mitocôndria, inibindo alguns complexos da cadeia de transporte de electrões ou funcionando como desacopladores entre o processo da fosforilação oxidativa e a cadeia de transporte (Nauen e Bretschneider, 2002). Por outro lado, destacam-se os análogos das hormonas ecdisonas (esteróide) e hormona juvenil (sesquiterpenóide) como alternativas de sucesso no controlo dos insectos (Dhadialla *et al.* 1998). Estes compostos mimetizam o efeito das hormonas responsáveis pela iniciação e coordenação dos processos de muda larvar e de metamorfose, funcionando como aceleradores nas mudas dos insectos (Nauen e Bretschneider, 2002).

Todavia, no que diz respeito aos modos de actuação dos constituintes de OEs, o conhecimento é ainda reduzido. Sabe-se, no entanto, que alguns constituintes dos OEs podem desempenhar um papel inibitório na actividade da enzima acetilcolinaesterase (AChE), tal como se verifica para a maioria dos insecticidas. A inactivação ou inibição desta última pode ser irreversível e resultar numa acumulação do neurotransmissor acetilcolina nas fendas sinápticas e nas junções neuromusculares. Desta acumulação de acetilcolina resulta uma estimulação contínua das fibras colinérgicas e do sistema nervoso central e periférico tendo como consequência final a paralisia e a morte (Shaaya e Rafaeli, 2007). Alguns estudos *in vitro* com monoterpenos (citral, linalool, acetato de bornilo, 1,8-cineole) revelaram uma inibição da AChE e uma actividade letal proporcional à dose fornecida. Porém, Kostyukovsky e colaboradores (2002) demonstraram que a percentagem de inibição da enzima era menor do que esperada para o nível de mortalidade induzido, não permitindo justificar as reduzidas doses letais registadas. A indicação de que a AChE não seria provavelmente o único alvo levou os autores a prosseguir os ensaios *in vitro* recorrendo a tecidos epidérmicos de abdómen de *Helicoverpa armigera*. A adição de constituintes em concentrações muito reduzidas, revelou um aumento significativo do nível intracelular de AMP cíclico, um efeito muito similar ao registado para o tratamento com o neurotransmissor/neuromodulador, octopamina. Com a aplicação de um antagonista da octopamina, estes puderam demonstrar uma provável interacção dos constituintes com os receptores

octopaminérgicos (Kostyukovsky *et al.*, 2002). A octopamina desempenha múltiplos papéis nas funções fisiológicas dos invertebrados podendo actuar como neurotransmissor, neurohormona, e neuromodulador de uma forma análoga à norepinefrina dos vertebrados (Kostyukovsky *et al.*, 2002). De facto, actualmente, foram identificados pelo menos três tipos diferentes de receptores octopaminérgicos nos insectos (Evans e Robb, 1993), cada um acoplado a sistemas distintos de mensageiros secundários (Kostyukovsky *et al.*, 2002). Uma actividade fisiológica dos constituintes de OEs ao nível de uma classe específica de receptores (subtipo-2) tem sido proposta como hipótese mais plausível. Este subtipo, em particular, encontra-se acoplado à enzima adenilato ciclase, responsável pela catálise de ATP em AMPc e acumulação intracelular deste mensageiro secundário (Enan, 2001). Até então, não foi encontrada nenhuma categoria de receptores octopaminérgicos nos vertebrados que se assemelhe ao subtipo-2 (Evans, 1984). Por este motivo, este subtipo-2 dos receptores octopaminérgicos tem sido indicado por alguns autores como um alvo específico dos insectos podendo-se revelar uma estratégia para atenuar os efeitos colaterais causados nos organismos superiores (Kostyukovsky *et al.*, 2002; Shaaya e Rafaeli, 2007).

Existe ainda muito por descobrir sobre as actividades fisiológicas dos OEs nos insectos nomeadamente ao nível de outros receptores. Sabe-se porém, no que diz respeito aos receptores octopaminérgicos de tipo-2, que a capacidade de competição dos constituintes de OEs com a octopamina tem uma natureza e intensidade variável sendo que alguns compostos podem actuar como agonistas ou antagonistas (Enan 2001). Este autor demonstrou que a capacidade insecticida de três constituintes (eugenol, α -terpineol e álcool cinâmico) era igualmente dependente da espécie de insecto (Enan 2001). Por outro lado, a clonagem apropriada das proteínas dos receptores e a determinação das suas estruturas tridimensionais constitui um aspecto essencial no estudo de potenciais alvos nos insectos. Recentemente, foi reportada a primeira clonagem de um receptor de octopamina proveniente de *Periplaneta americana* (Bischof e Enam, 2004). A expressão e o estudo funcional deste receptor constituem um passo importante para a sua caracterização. Espera-se que, no futuro, este tipo de dados venha facilitar não só a identificação de análogos mas possibilite também a identificação de potenciais antagonistas que bloqueiem as respostas nervosas/hormonais ao nível do receptor. O conhecimento aprofundado dos modos de interacção dos químicos com os receptores irá certamente possibilitar o desenvolvimento de uma nova geração de pesticidas mais específicos e de utilização mais bioracional.

1.4.2.2. Potencialidades e resultados de actividades anti-insecto de fragrâncias vegetais

Quando centrarmos a nossa atenção para as espécies de plantas em estudo neste trabalho, constatamos que, na globalidade, não existem tantos ensaios publicados sobre as actividades anti-insecto quanto os esperados. Tanto quanto é do nosso conhecimento, *L. angustifolia* será provavelmente a espécie que reúne mais trabalhos deste género, embora muitos não sejam só dirigidos a insectos mas mais à classe Arthropoda em geral.

O OE de lavandula (*L. angustifolia*) é utilizado tradicionalmente pela sua acção insecto-repelente, tendo sido igualmente incorporado em alguns produtos comercializados como repelentes de traças ou mosquitos (Peterson e Coats, 2001). Esta actividade repelente da *L. angustifolia* foi já confirmada em diversas espécies de artrópodes. Num ensaio realizado em campo contra uma praga de macieiras enxertadas, foi conseguida uma redução da infestação/deposição de ovos por *Resseliella oculiperda* (Diptera: Cecidomyiidae) em 95% através da aplicação de bandas impregnadas com OE de alfazema (van Tol *et al.*, 2007). Num ensaio de laboratório o OE de *L. angustifolia* distinguiu-se com uma actividade repelente média contra *Lasioderma serricorne*, uma das pragas mais importantes de culturas armazenadas (Hori, 2003). Por outro lado, a eficiência do OE enquanto repelente contra espécies de outra classe de artrópodes (*Arachnida*) foi também verificada nomeadamente na carraça *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) (Jaenson *et al.*, 2006). Em termos de toxicidade, foram registados efeitos acaricidas muito significantes (extremamente tóxico a letal) em espécies de *Euseius yousefi* (Amer e Momen, 2005) e *Eutetranychus orientalis* (Refaat *et al.*, 2002). Do mesmo modo, a aplicação do OE de *L. angustifolia* assim como o seu constituinte principal o linalool (27%), evidenciaram actividade acaricida (por inalação) contra o ácaro parasita do coelho (*Psoroptes cuniculi*). Foi demonstrado que este último composto não seria o único constituinte activo (Perrucci *et al.*, 1996).

Por seu lado, o funcho foi já identificado como uma planta com grande potencial repelente. Extractos de frutos de *F. vulgare* em hexano conferiram 100% de protecção contra fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) em ensaios sobre a pele. Os constituintes activos responsáveis pela repelência foram identificados como a (+)- fenchona e o ácido (E)-9-octadecanóico, tendo o primeiro exibido maior actividade (Kim *et al.*, 2002). Adicionalmente, uma experiência com o isómero ácido (Z)-9-octadecanóico demonstrou que este possuía um potencial repelente superior (Kim *et al.*, 2002). Para a mesma espécie de mosquito, foi registada uma elevada actividade tóxica do OE de frutos de funcho

contra as larvas (CL50 =24 mg/l) tendo sido atribuída a actividade ao E-anetole (CL50= 15mg/l) o composto principal (Chantraine *et al.*, 1998). Outra investigação revelou a actividade tóxica de compostos extraídos do OE de frutos de funcho (por fumigação e por contacto) contra três pestes das colheitas armazenadas (coleópteros). O estragole e a (+)- fenchona exibiram uma actividade adulticida elevada em *Sitophilus oryzae* e *Callosobruchus chinensis* enquanto o (E)-anetole mostrou ser mais eficiente contra *Lasioderma serricorne* (Kim e Ahn, 2001). Embora o EO de frutos de *F. vulgare* tenha sido referido por Kim *et al.* (2002) como eficiente na repelência contra *Aedes aegypti*, um ensaio de Hori (2003), não permitiu distinguir o OE de frutos de funcho como um dos OEs mais repelentes ainda que o seu efeito tivesse sido ligeiramente superior ao OE de alfazema.

Por seu lado, o OE de frutos de salsa (*P. crispum*), também incluído nesse estudo, não teve qualquer efeito repelente contra as fêmeas de *Lasioderma serricorne* tendo-lhe sido atribuído um efeito neutro (Hori, 2003). Relativamente a esta última espécie, foram encontradas poucas publicações acerca da aplicação dos OEs desta planta em ensaios anti-insecto. Num bio-ensaio contra o mosquito *Ochlerotatus caspius* o EO de frutos de *Petroselinum crispum* apresentou uma forte actividade larvicida (CL50 e CL90 iguais a 34 e 62 µg/l respectivamente), tal como o OE de flores de *Thymus vulgaris* (Knio et al., 2008).

Do mesmo modo, os trabalhos dirigidos para o potencial insecticida de aneto (*A. graveolens*) e dos constituintes dos seus OEs têm sido igualmente escassos. Porém a avaliação da actividade larvicida contra mosquitos já foi levada a cabo (Lichtenstein *et al.*, 1974; Amer e Mehlhorn, 2006). O OE de aneto revelou-se extremamente letal contra as larvas de *Culex quinquefasciatus* (CL50 ≤ 10 ppm) e relativamente tóxico para as larvas de *Aedes aegypti* (CL50 ≈ 50 ppm). Todavia, outra espécie, *Anopheles stephensi*, exibiu uma menor sensibilidade ao mesmo extracto (CL50 ≈ 100 ppm) (Amer e Mehlhorn, 2006). Três décadas antes, Lichtenstein e seus colaboradores já haviam dado uma atenção particular aos extractos aquosos e orgânicos de aneto (partes verdes e raízes) tendo sido revelados alguns aspectos interessantes da sua composição e toxicidade. Uma elevada actividade larvicida contra *Aedes aegypti* e *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta), assim como um efeito sinérgico quando adicionado a insecticidas convencionais, foi atribuída à presença abundante de α -carvona nos extractos aquosos das partes verdes de aneto (Lichtenstein *et al.*, 1974). No entanto, quando estes autores testaram alguns dos compostos presentes em teores menores nos extractos de folhas e raízes, nomeadamente o apiole, o dill apiole e a miristicina, verificou-se que estes apresentavam actividades

letais significativamente superiores à da α -carvona (CL50 de 11.5, 11.0, 11.8 e 107 ppm, respectivamente). Embora não se encontrem muitas referências sobre a actividade insecticida do aneto nestes últimos anos, têm surgido evidências que apontam para o potencial insecticida desta planta, mais especificamente alguns dos seus compostos maioritariamente presentes nas raízes (apiole, dillapiole e miristicina).

Como é óbvio, muitas outras plantas têm sido avaliadas distinguindo-se pelas suas aplicações promissoras, nomeadamente espécies do género *Thymus* (Lamiaceae) e *Tagetes* (Asteraceae). Todavia, uma referência à maioria delas constituiria um desvio ao âmbito do trabalho, para além de que, tal tarefa seria demasiada exaustiva. Assim, apresentamos, na tabela 3, um pequeno resumo de alguns estudos direccionados para as actividades larvicidas de plantas cujos OEs exibiram melhores resultados até então.

Tabela 3. Apresentação resumida das actividades larvicidas de óleos essenciais de plantas contra várias espécies de mosquito.

Espécie vegetal	Mosquito alvo (larvas)	CL50 às 24h	CL90 às 24h	Referência
<i>Thymus serpyllum</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>	1 ppm	...	Amer e Mehlhorn, 2006
	<i>Aedes aegypti</i>	1 ppm	...	
	<i>Anopheles stephensi</i>	10 ppm	...	
<i>Amyris balsamifera</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>	1 ppm	...	Amer e Mehlhorn, 2006
	<i>Aedes aegypti</i>	1 ppm	...	
	<i>Anopheles stephensi</i>	≈12 ppm	...	
<i>Juniperus virginiana</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>	≈12 ppm	...	Amer e Mehlhorn, 2006
	<i>Aedes aegypti</i>	1 ppm	...	
	<i>Anopheles stephensi</i>	≈12 ppm	...	
<i>Tagetes patula</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>	22,3 ppm	71,9 ppm	Dharmagadda <i>et al.</i> , 2005
	<i>Aedes aegypti</i>	13,6 ppm	37,9 ppm	
	<i>Anopheles stephensi</i>	12,1 ppm	57,6 ppm	
<i>Cryptomeria japonica</i> (folhas)	<i>Aedes aegypti</i>	37,6 mg/l	71,9 mg/l	Cheng <i>et al.</i> , 2003
<i>Myrtus communis</i> (folhas)	<i>Culex pipiens molestus</i>	16 mg/l	59 mg/l	Traboulsi <i>et al.</i> , 2002
<i>Origanum syriacum</i> (folhas)	<i>Culex pipiens molestus</i>	36 mg/l	90 mg/l	Traboulsi <i>et al.</i> , 2002
<i>Tagetes pusilla</i>	<i>Aedes aegypti</i>	14,1 mg/l	18,8 mg/l (CL95)	Chantraine <i>et al.</i> , 1998
<i>Baccharis sp.</i>	<i>Aedes aegypti</i>	14,7 mg/l	20,5 mg/l (CL95)	Chantraine <i>et al.</i> , 1998
<i>Tagetes minuta</i>	<i>Aedes fluviatilis</i>	1 mg/l	1,5 mg/l	Macêdo <i>et al.</i> , 1997
<i>Eclipta paniculata</i>	<i>Aedes fluviatilis</i>	3,3 mg/l	17,2 mg/l	Macêdo <i>et al.</i> , 1997

1.4.3. Novas formulações para a aplicação de insecticidas - “*Delivery systems*”

A aplicação de insecticidas tem decorrido, até então, pela aplicação de algumas das formulações mais comuns existentes no mercado. Pós e grânulos solúveis, concentrados para emulsões ou suspensões são exemplos de formulações que têm tido mais utilização mas que apresentam no entanto diversas limitações (Perrin, 2000). Por outro lado, a tentativa de aplicar bio-pesticidas recorrendo a sprays tem tido um sucesso muito limitado essencialmente devido à ineficácia das formulações e à falta de equipamentos apropriados (Gan-Mor e Matthews, 2003). Esta realidade evidencia a divergência de resultados que pode existir quando se comparam estudos laboratoriais de bio-actividade com o que ocorre realmente aquando duma aplicação efectiva no terreno. A eficiência das formulações é directamente resultante das propriedades físico-químicas dos bio-pesticidas e da escolha de um sistema com um *design* que contribua para a disponibilização adequada destes compostos (Perrin, 2000). Como é óbvio, existe uma série de factores específicos não controláveis no contexto da aplicação e por este motivo, considera-se indispensável adquirir conhecimento não só sobre os compostos bio-activos mais adequados para um determinado caso, mas também sobre a forma como estes devem ser aplicados (Gan-Mor e Matthews, 2003).

Mais recentemente, devido ao desenvolvimento de novas tecnologias médicas para a libertação de drogas de forma extremamente eficiente à escala nano, surgiu a necessidade de desenhar sistemas semelhantes aplicáveis em termos agro-industriais. As nano/microemulsões, as nanosferas, nanocápsulas, lipossomas e complexos de lípidos ou ciclodextrinas são exemplos típicos de formulações à escala reduzida (Sasson *et al.*, 2007). O recurso à encapsulação, em particular, apresenta-se actualmente como uma estratégia de elevado potencial na protecção da saúde animal (controlo de vectores de doenças) e das culturas agrícolas. As microcápsulas, por exemplo, são sistema de libertação que permitem estabilizar as formulações e reduzir a degradação dos compostos mais sensíveis (luz, ar, humidade, microrganismos, etc.) limitando igualmente a volatilização destes, no caso de se tratar de constituintes de OEs (Perrin, 2000). Dependendo do seu *design*, as formulações de microcápsulas podem permitir uma redução da dosagem na aplicação atenuando consequentemente o impacto no ambiente e nos organismos vivos (Perrin, 2000). Uma libertação dos compostos de forma mais prolongada e eficiente pode ser propiciada por manipulação de diversos factores (Perrin, 2000). De certa forma, existe uma garantia acrescida do prolongamento das actividades biológicas contra os

alvos, embora a avaliação previa dessa bioactividade em diversos ensaios seja imprescindível. As microformulações são exemplos de novas formulações que têm sido desenvolvidas para a aplicação de insecticidas no domínio da agricultura. O leque de aplicações deste tipo de formulações é imenso tendo em conta a sua função e as vantagens que apresentam. A encapsulação de OEs em polímeros de vidro (Peppas e Am Ende, 1997), goma-arábica/maltodextrina (Fernandes *et al.*, 2008), gelatina (Moreti *et al.*, 2002), etc. tem sido alvo de estudo nomeadamente no sentido de avaliar diversos parâmetros como a capacidade de incorporação, propriedades térmicas, modo de libertação e eficiência da actividade biológica.

Por seu lado, o recurso à nanotecnologia (nanosuspensões) na protecção de culturas agrícolas tem tido, até ao momento, uma presença reduzida no mercado apesar do enorme potencial de aplicação deste tipo de formulações (Sasson *et al.* 2007). A nanonização de partículas potencia a sua solubilização facilitando os processos de libertação e absorção por parte dos organismos. As nanosuspensões de compostos bio-activos necessitam porém de uma estabilização das partículas. Para aumentar a estabilidade das suspensões e inibir o processo de aglomeração, recorre-se frequentemente a pequenas quantidades de agentes de estabilização superficial, nomeadamente alguns surfactantes (PEG, PPG, SDS, polisorbatos, etc.). Embora se deva sempre ter em conta uma possível toxicidade destes, a não utilização de solventes já permite uma redução do impacto ambiental (Sasson *et al.*, 2007).

1.4.4. Os Culicídeos: Insectos vectores de agentes patogénicos

Os mosquitos são insectos pertencentes à família Culicidae, um taxon monofilético incluído na ordem Diptera (Harbach, 2007). Os culicídeos constituem um grupo extremamente abundante, de ampla distribuição em diversos locais do globo, com particular presença em zonas temperadas e tropicais. Presentemente, reconhecem-se formalmente cerca de 3490 espécies (Harbach, 2007), porém, na realidade, este número poderá ser muito superior se considerarmos que, como acontece no género *Anopheles*, existem vários complexos de espécies cujos membros são isomórficos. No contexto dos mosquitos vectores de doenças, interessa distinguir em particular as três subfamílias: Anophelinae, Culicinae e Toxorhynchitinae. O género *Anopheles* constitui um dos três géneros de anofelíneos enquanto os géneros *Culex*, *Aedes* e *Mansonia* pertencem ao enorme grupo dos culicíneos (Harbach, 2007).

Estes dípteros de pequeno porte apresentam um par de asas funcionais compridas e estreitas, um corpo delgado com patas finas e alongadas sendo igualmente reconhecidos pelo longo probóscis projectado para diante e os palpos maxilares (cinco segmentos) de tamanho variável (Service, 1996). A cabeça é pequena e esférica, com olhos reniformes, compostos e sem ocelos. Por seu lado, as antenas apresentam um grande dimorfismo sexual permitindo fazer a distinção entre os machos e as fêmeas conforme o comprimento (quinze ou dezasseis segmentos, respectivamente) e a quantidade de sedas (plumosas ou pilosas, respectivamente) (Service, 1986) (figura 9). Para além das patas e asas com características distintivas, o tórax apresenta uma série de outras estruturas (forma do escutelo, distribuição das sedas, etc.) de grande valor taxonómico na identificação das subfamílias permitindo assim distinguir os Culicíneos (Culicinae) dos Anophelinos (Anophelinae). Os estádios imaturos dos mosquitos desenrolam-se em meio aquático numa diversidade enorme de habitats naturais (riachos, poços, terrenos inundados, cavidades naturais com água, plantas, etc.) ou construções humanas (tanques, piscinas, reservatórios, vasos, etc.). Observam-se quatro estádios larvares (figura 11) em que as larvas se alimentam de partículas em suspensão (leveduras, bactérias, protozoários, algas, etc.) (Service, 1986). Estas distinguem-se de outros insectos aquáticos pela ausência de patas e presença de uma cabeça característica, um tórax volumoso, de largura superior a esta última (Service, 1986) e um abdómen com nove segmentos cobertos por placas quitinizadas e diversas sedas (simples ou ramificadas) (Service, 1986) (figura 10, esquerda). A respiração das larvas efectua-se à superfície da água por aberturas respiratórias situadas no oitavo segmento do abdómen (pelo sifão respiratório nos Culicíneos ou pelos espiráculos, nos Anofelíneos) (Jetten e Takken, 1994). o desenvolvimento larvar (desde o ovo à pupa) pode ser relativamente curto em países tropicais (sete a quatorze dias). Porém, em zonas temperadas, pode se estender por semanas ou meses. Posteriormente as larvas no quarto estágio dão origem a pupas (figura 10, direita), também de vida livre, que passam a respirar pelas trompetas respiratórias mas que não necessitam de alimentação durante esta última fase de desenvolvimento até a emergência do mosquito.

Os mosquitos fêmeas de um grande número de espécies alimentam-se do sangue de animais vivos sendo atraídas por vários estímulos emanados pelas presas (odores, calor corporal, dióxido de carbono) (Service, 1986). As fêmeas de muitas espécies procuram geralmente animais de sangue quente (incluindo o homem), embora algumas prefiram outro tipo de animal (zoofágicas) e possam nunca se alimentar de sangue humano (Harbach, 2007).



Figura 9. Fotografia da observação ao estereomicroscópio de culicídeos adultos pertencentes à espécie *Anopheles atroparvus* Van Thiel, 1927 (anofelíneos). Exemplar fêmea com abdômen volumoso e antenas pilosas à esquerda e exemplar macho com abdômen delgado e antenas plumosas à direita.



Figura 10. Fotografias das observações ao estereomicroscópio das duas últimas fases de desenvolvimento aquáticas de um anofelíneo - *Anopheles atroparvus*, van Thiel, 1927. À esquerda: Exemplar de larva no quarto estágio larvar com cerca de 6 mm de comprimento. O corpo das larvas está dividido em cabeça, tórax e abdômen. À direita: Exemplar de uma pupa com cerca de 4-5 mm de comprimento. Na parte anterior distingue-se o cefalotórax com as trompetas respiratórias e o abdômen segmentado.

A refeição sanguínea após a fecundação é essencial para o processo de maturação dos ovos (Jetten e Takken, 1994). O tempo decorrido entre duas refeições de sangue, incluindo a procura de hospedeiro, digestão e a postura dos ovos, é designado de ciclo gonotrófico. Este ciclo varia consideravelmente e depende essencialmente da taxa de digestão do sangue que, por seu lado, é resultante de factores diversos (espécies, temperatura e humidade) (Jetten e Takken, 1994). Os machos, que se alimentam de sangue, e algumas fêmeas de várias espécies recorrem a sucos de origem vegetal (néctares, exsudados de plantas, sumos de frutas, etc.) como fontes de energia para a reprodução, o voo ou como forma de sobrevivência (Jetten e Takken, 1994). Conforme o período em que exercem a actividade ocorra de dia ou durante a noite, os mosquitos podem ser designados de diurnos (*Aedes*),

crepusculares ou nocturnos (*Anopheles* e *Culex*), respectivamente. Contudo, nem todas as espécies demonstram esta tendência.

O hábito alimentar das fêmeas, isto é, a picada no hospedeiro, constitui o aspecto fundamental para o carácter epidemiológico e transmissível de muitas doenças. Os mosquitos não são sempre e/ou unicamente vectores na transmissão de doenças. Estes representam, inclusivamente, consideráveis pestes para os humanos por serem geradores de respostas alérgicas e reacções sistémicas. Relativamente à transmissão de agentes patogénicos causadores de doenças humanas e animais, são várias as espécies de mosquito envolvidas. De entre uma diversidade de grupos de organismos nocivos, estas espécies, essencialmente confinadas aos géneros *Anopheles*, *Aedes* e *Culex*, são das maiores causas de mortalidade humana, mesmo que indirectamente (Harbach, 2007).

Tabela 4. Breve sumário das principais espécies de mosquito vectores envolvidos na transmissão de agentes patogénicos causadores de graves doenças e mortalidade em todo o mundo.

Doenças	Agente(s)	Géneros de Vectore(s)	Principais espécies
Malária	<i>Plasmodium falciparum</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. ovale</i> , <i>P. vivax</i>	<i>Anopheles</i> spp.	<i>An. gambiae</i> , <i>An. arabiensis</i> , <i>An. funestus</i>
Filariose	<i>Wuchereria bancrofti</i>	<i>Anopheles</i> spp., <i>Culex</i> spp. e <i>Aedes</i> spp.	<i>An. gambiae</i> , <i>An. arabiensis</i>
	<i>Brugia malayi</i> (zoonose)	<i>Anopheles</i> spp. e <i>Mansonia</i> spp.	
	<i>Brugia timori</i>	<i>Anopheles</i> spp.	
Dirofilariose	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>Anopheles</i> spp. e <i>Culex</i> spp.	
Arboviroses*	Vírus da Febre-amarela	<i>Aedes</i> spp.	<i>Ae. Aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i>
	Vírus do Dengue	<i>Aedes</i> spp.	<i>Ae. Aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i>
	Vírus West Nile	<i>Culex</i> spp e <i>Anopheles</i> spp.	
	Febre do Vale do Rift	<i>Culex</i> spp.	

* Distinguem-se igualmente outras arboviroses, nomeadamente encefalites. Nota: A informação constante na tabela foi gentilmente cedida pelo Professor Doutor A. J. dos Santos Grácio e encontra-se descrita por Service M. W. (1986) e Service M. W. (1996).

Por seu lado, os agentes patogénicos transmitidos por mosquitos podem ser de naturezas distintas, abrangendo tanto vírus, como protozoários e helmintas. Os vírus são responsáveis por um conjunto de doenças distintas agrupadas sobre a designação geral de arboviroses (o termo deriva da designação “*arthropod-borne-virus*”) (Service, 1986) (tabela 4). As arboviroses resultam em milhões de casos anualmente, a maioria deles associados ao vírus do Dengue que pode causar a febre hemorrágica e a síndrome de choque do Dengue (World Health Organization, 1996). Alguns helmintas

são igualmente responsáveis por graves doenças crónicas (filarioses) como é o caso da filariose linfática ou elefantíase, causada pelos parasitas *Wuchereria bancrofti* e *Brugia timori* que se alojam nos vasos linfáticos e provocam linfedemas. Esta doença afecta cerca de oitenta milhões de pessoas na África (Este e Sul do continente) e o Sul da Ásia (World Health Organization, 1996). No entanto, actualmente, a doença causadora de maior morbilidade e mortalidade, sobretudo nas crianças, ainda continua a ser a malária. As causas da doença assim como o papel dos vectores do género *Anopheles* spp. na incidência da malária, presentemente e no futuro, serão tratados no próximo ponto.

Para a maioria destas doenças não existem vacinas ou tratamentos eficazes. Até mesmo no caso da malária, têm-se verificado um desenvolvimento crescente na resistência dos parasitas, apesar de todos os esforços realizados na aplicação de novas drogas para o tratamento da doença. A experiência tem vindo a demonstrar que o controlo vectorial será provavelmente a estratégia mais efectiva para a redução da transmissão de todas estas doenças. Por esse motivo, é essencial direccionar os esforços nesse sentido, desenvolvendo novos métodos e/ou substâncias contra os estes e outros artropodes transmissores de doenças (Chantraine *et al.*, 1998). Acredita-se que os estádios larvares são alvos bastante atractivos, num contexto de eventual intervenção contra o vector, já que estes se encontram localizados em habitat aquáticos, sendo mais fácil o seu controlo. Porém, o uso de insecticidas convencionais no meio aquático não é uma solução aceitável pois representa um grande risco de contaminação do ambiente, podendo acarretar problemas de poluição e graves complicações de saúde (Amer e Mehlhorn, 2006). Neste caso, o uso de produtos naturais de origem vegetal revela-se uma estratégia mais conveniente numa luta localizada contra os estádios larvares dos mosquitos.

1.4.4.1. O mosquito *Anopheles atroparvus* van Thiel, 1927 (Diptera, Culicidae): um vector da Malária na Europa

Segundo a classificação tradicional, o género *Anopheles*, em conjunto com dois outros géneros (*Bironella* e *Chagasia*), insere-se na subfamília Anophelinae, sendo esta última incluída na família Culicidae (White, 1977; Harbach, 2007). Em 1977, White descreveu o género como sendo constituído por 362 espécies enquanto, mas recentemente, Harbach (2004) já distinguia formalmente 444 espécies. O género *Anopheles* é cosmopolita (Harbach, 2007) e conta com o maior número de espécies relativamente ao restantes géneros, podendo ser subdividido em seis subgéneros (White, 1977, Harbach, 2004). Por outro lado, segundo Harbach (2007), este género subdivide-se

hierarquicamente em categorias taxonómicas mais informais como secções, séries, grupos, subgrupos e complexos. É precisamente num destes complexos, *Anopheles maculipennis*, que se insere a espécie *An. atroparvus* van Thiel, 1927.

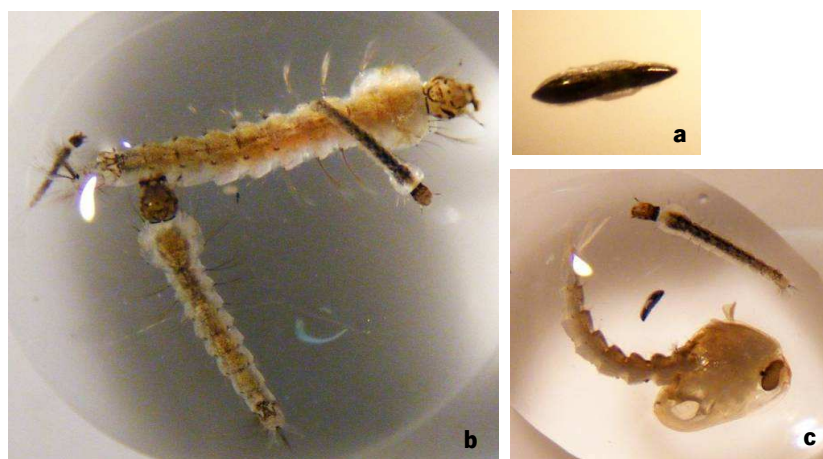


Figura 11. Fotografias dos diferentes estádios de desenvolvimento aquático do mosquito anofelíneo: *An. atroparvus* van Thiel, 1927, tiradas aquando da observação ao estereomicroscópio de exemplares vivo. a) Ovo ampliado cerca de vinte vezes mostrando a sua coloração escura (exocório pigmentado) e estrutura alongada com flutuadores laterais. b) Apresentação de exemplares dos quatro estádios larvares ampliados cinco vezes. c) Comparação das diferenças de tamanho entre o ovo, a larva no segundo estágio larvar e a pupa (ampliação de cinco vezes).

Os anofelíneos partilham características comuns que permitem distingui-los dos culicíneos. De entre um conjunto particular de características, refere-se, por exemplo, o tipo de ovo com flutuadores, isolado e em forma de barco (figura 11, a) ou a ausência de sifão respiratório nas larvas (figura 11, b) que se dispõem paralelamente à superfície da água, quando respiram. Em contraste com outros culicídeos, os anofelíneos adultos, quando pousados, apresentam o eixo corporal na diagonal relativamente à superfície em que pousam e ambos os sexos exibem palpos de comprimento igual ao probóscis (Service, 1986). No entanto, para espécies pertencentes ao mesmo complexo, a semelhança morfológica dos estádios de desenvolvimento (larva, pupa ou adulto) é de tal forma elevada que não permite uma distinção com base neste critério (Jetten e Takken, 1994). Porém, White (1978) propôs uma chave de identificação para o complexo *maculipennis* baseada na morfologia dos ovos e em características cromossómicas, definindo assim treze espécies (White, 1978).

O conjunto de espécies do complexo *maculipennis* tem uma elevada importância, pois estas situam-se entre as espécies de mosquitos reconhecidas como vectores da malária, tendo sido, no início do século passado, maioritariamente responsáveis pela transmissão da malária em muitos países do

continente Europeu. As espécies *An. atroparvus*, *An. sacharovi* e *An. labranchiae*, foram sistematicamente associados a casos endémicos de malária em países como a Grécia, Itália, Espanha e Portugal (Jetten e Takken, 1994). É de referir, que outras espécies do género, não incluídas no complexo *maculipennis*, desempenharam igualmente o seu papel na transmissão da doença no Sudoeste Europeu, embora secundariamente (Jetten e Takken, 1994).

A malária, também, conhecida como paludismo ou sezonismo, está associada a diversos períodos da história de Portugal. Mais recentemente, entre o século XIX e início do século XX, a malária desenvolveu-se com elevadas taxas de incidência em zonas de bacias hidrográficas, perto de rios e mais particularmente em arrozais (Vale do Sado) (Cambournac, 1994). Segundo Cambournac (1942), a transmissão ocorria especialmente de Abril a Outubro, sendo o parasita *Plasmodium vivax* comum no Norte do País, enquanto, mais a Sul, era prevalente o *P. falciparum*. A doença e sua propagação foram sendo controladas com a implementação de diversas medidas (controlo químico e biológico do vector, prevenção da transmissão, tratamento dos doentes, etc.) permitindo assim uma redução da sua ocorrência no país e sua final eradicação (1962) (Cambournac, 1994).

A malária é uma das doenças mais importantes pela sua distribuição geográfica, incidência e elevada mortalidade. Esta doença constitui um problema de saúde humana à escala mundial atingindo inúmeros países, a grande maioria deles situados no continente africano (World Health Organization, 1996). A OMS estima que, todos os anos, surgem entre 300 a 500 milhões de casos em todo o mundo, causando entre 1,4 a 2,6 milhões de mortes. Esta doença é a causa principal de uma elevada morbilidade e mortalidade infantil registada nos países afectados (World Health Organization, 1996).

Como foi referido na tabela 4, a malária é causada pela transmissão de uma das quatro espécies de protozoários do género *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*), que pode ser inoculado para o humano (na forma de esporozóitos) por algumas espécies de mosquitos do género *Anopheles*, através da picada de fêmeas infectadas (figura 12) (Jetten e Takken, 1994).

A infecção de um mosquito que tenha efectuada uma refeição sanguínea com sangue contendo os gametócitos, não surge imediatamente, pois o parasita necessita de completar o seu período de incubação extrínseco dentro do corpo do insecto (zigoto, oocinetos, oocistos e esporozóitos) (figura 12). Após o completar do ciclo esporogónico do parasita, a uma temperatura mínima adequada, o mosquito torna-se infectante durante a maior parte da sua vida (Jetten e Takken, 1994).

Já dentro do hospedeiro humano, o parasita passa por um período de incubação intrínseco (exo-eritrocítico). É posteriormente, durante a fase eritrocítica, que os sintomas da doença como a anemia e

a febre fazem-se sentir, em consequência da ruptura dos eritrócitos e libertação dos esquizontes para o sangue (Jetten e Takken, 1994).

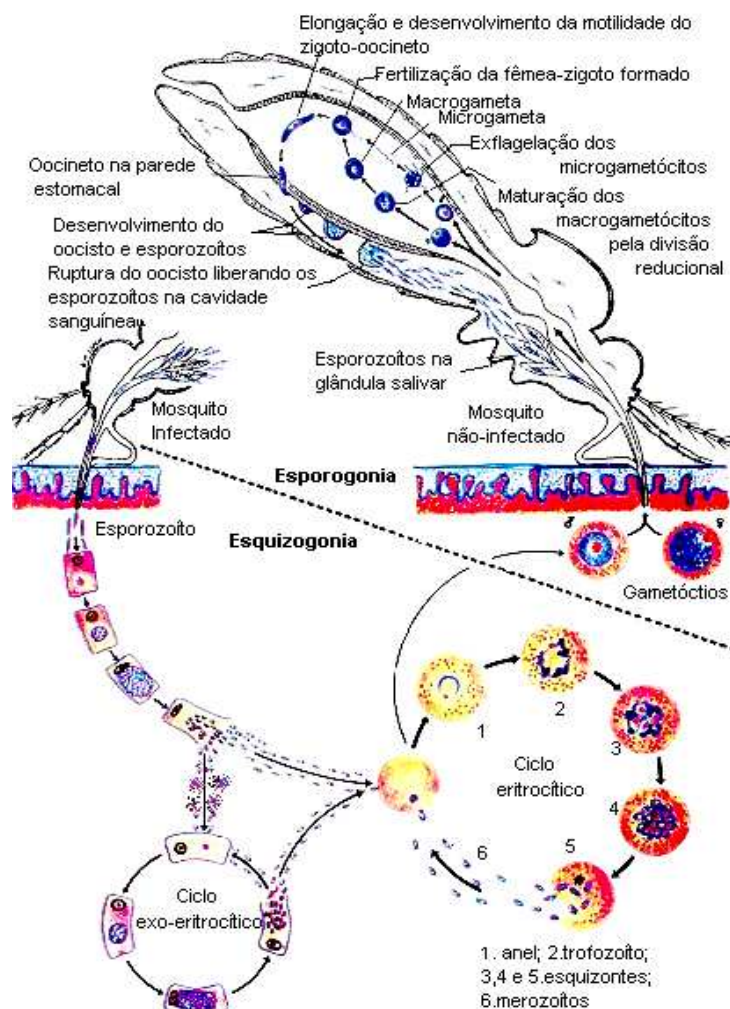


Figura 12. Apresentação esquemática do ciclo de vida do *Plasmodium* sp. entre o hospedeiro humano (fase esquizogônica) e o mosquito (fase esporogônica). A figura dá ênfase ao desenvolvimento do parasita no interior do mosquito para se compreender melhor a infecção do mosquito e o seu papel como vector na transmissão da doença. (imagem extraída do site: www.ib.usp.br)

O controlo da malária tem sido um desafio severamente dificultado pelo desenvolvimento de multiresistências, tanto por parte dos vectores aos insecticidas utilizados (DDT, propoxur, bendiocarb, permetrina, deltametrina, etc.) como dos parasitas aos fármacos antimaláricos (World Health Organization, 1996). A mesma resistência foi verificada em colónias de adultos de *A. atroparvus* proveniente de Espanha. Estas últimas demonstraram serem resistentes a organofosfatos e

carbamatos e evidenciaram a ocorrência de resistência cruzada para uma série de insecticidas (Hemingway e Davidson, 1983).

Apesar das campanhas de erradicação terem sido eficientes no controlo da doença que se instalou na Europa durante o século XX, esta ainda surge no continente na forma de casos importados, principalmente em consequência do aumento do tráfego internacional de passageiros aéreos provenientes de países onde a malária é endémica (Jetten e Takken, 1994). Desde os anos 70, o número de casos importados registados tem vindo a aumentar atingindo anualmente mais de dez mil casos. No entanto, calcula-se que na realidade este valor seja subestimado (Jetten e Takken, 1994). Por outro lado, a ocorrência actual de alguns vectores na Europa é um factor importante na transmissão da doença se considerarmos que, como no caso de Portugal a incidência da doença no passado era dependente da densidade do vector (Capinha *et al.*, 2009). Actualmente, prevê-se que a distribuição de *An. atroparvus* em Portugal seja similar à distribuição registada no passado (Capinha *et al.*, 2009). A falta de co-adaptação entre os vectores e os parasitas é um aspecto que poderá conferir alguma protecção contra a introdução de parasitas importados. No entanto, existem dados laboratoriais que indicam alguma susceptibilidade de *An. atroparvus*, e outros mosquitos do género, ao *P. vivax* proveniente da África e Ásia (Jetten e Takken, 1994). Por outro lado, sabe-se que a malária está estritamente relacionada com os factores ambientais e que alterações de humidade e temperatura podem reflectir-se numa mudança na distribuição, densidade e longevidade dos vectores (Jetten e Takken, 1994). Assim sendo, são vários os dados que nos sugerem que uma reintrodução do parasita nalgumas regiões da Europa não deve ser subestimada. Existe uma real possibilidade de as mudanças climáticas, que se prevêem para o futuro, contribuírem para um aumento do potencial de transmissão, permitindo uma re-emergência sazonal da malária em locais onde esta não é endémica. Por enquanto, segundo Capinha e colaboradores (2009), a distribuição de *An. atroparvus* em Portugal, por exemplo, ainda não se encontra afectada pelo aumento de temperatura, tendo-se mantido similar à distribuição registada nas últimas sete décadas. Estes autores prevêem que, a curto prazo, a alteração do clima não venha a influenciar directamente ou de forma significativa a distribuição das populações, especialmente a norte da Europa (Capinha *et al.*, 2009).

1.5. Objectivos

Na generalidade, este trabalho de dissertação de mestrado pretendeu dar um contributo para o conhecimento fitoquímico das espécies descritas na introdução enquadrando-as num objectivo principal direccionado para uma futura concepção e produção biotecnológica de fragrâncias com possível impacto no controlo de insectos, nomeadamente mosquitos vectores de agentes patogénicos.

No contexto dos tópicos abordados nas secções anteriores, facilmente se percebe uma diversidade de assuntos envolvendo áreas científicas distintas. Assim, para atingir o propósito geral, surgiu a necessidade de definir objectivos mais específicos relacionados com (1) a fitoquímica das fragrâncias (OEs), (2) abordagens biotecnológicas para a produção de compostos e (3) bio-ensaios laboratoriais em insectos (larvas de mosquitos). Deste modo, distinguem-se três tipos de trabalhos experimentais desenvolvidos:

(1) Caracterização química dos compostos aromáticos presentes nos OEs das plantas *in vivo* e culturas *in vitro*: Efectuar um estudo fitoquímico aprofundado dos OEs extraídos a partir de uma ou mais tipologias de material vegetal provenientes das quatro espécies em estudo: *Lavandula angustifolia*, *Foeniculum vulgare* var. *vulgare*, *Petroselinum crispum* spp. *neapolitanum* e *Anethum graveolens*.

(2) Estabelecimento de culturas *in vitro* das quatro espécies para o estudo e optimização da bio-produção de fragrâncias *in vitro*: Estabelecer culturas *in vitro* de plântulas, órgãos, ou *calli* e optimizar as condições de cultivo para a produção *in vitro* de OEs ou compostos bioactivos nomeadamente por transformação mediada por *Agrobacterium rhizogenes*.

(3) Avaliação da actividade insecticida - ensaios larvicidas: Proceder a uma avaliação preliminar do potencial insecticida das plantas em estudo procedendo à realização de ensaios de actividade biológica em larvas de *Anopheles atroparvus*, uma espécie de mosquito com uma importância eminente num futuro contexto de transmissão da Malária na Europa.

Com o desenvolvimento deste trabalho, pretende-se adquirir não só alguns conhecimentos técnico-científicos nesta área dos bio-insecticidas assim como algumas indicações do potencial insecticida dos OEs e prováveis compostos bio-activos envolvidos na actividade larvicida. Espera-se que tais conhecimentos possam servir de base a futuros trabalhos direccionados, nomeadamente, para a elaboração de formulações com actividade insecticida.

2. Material e Métodos

2.1. Culturas *in vitro*

Tendo em conta, a grande utilidade das culturas de plantas ou tecidos de espécies vegetais no que diz respeito a estudos fitoquímicos e metabólicos, defeniu-se o estabelecimento de culturas *in vitro* de plântulas, órgãos, *calli* e/ou suspensões celulares das diferentes espécies em estudo como uma das três linhas principais deste trabalho. Deste modo, pretendia-se efectuar a caracterização dos OEs e compostos de natureza volátil produzidos ou acumulados em condições de cultura controladas, comparando com os perfis das plantas *in vivo* e, se possível, dar os primeiros passos na exploração do metabolismo secundário destas plantas para a produção de compostos bio-activos.

Na fase inicial da investigação, a espécie *L. angustifolia* já se encontrava pré-estabelecida em culturas permitindo que se considerassem outras abordagens de estudo *in vitro* a partir de culturas pré-estabelecidas. No caso das três espécies de Apiaceae seleccionadas não existia qualquer material vegetal, *in vivo* ou *in vitro*, imediatamente disponível no início dos trabalhos. Por esse motivo, antes mesmo de considerar qualquer estudo de optimização das condições de cultura, foi necessário adquirir material vegetal destas espécies, submetendo as respectivas sementes e/ou explantes de material vegetativo a técnicas de desinfecção para a iniciação de culturas *in vitro*. A implementação e conservação das condições de assepsia foram as preocupações de maior peso desde a fase inicial dos trabalhos, sendo a obtenção de culturas assépticas o grande passo limitante para o desenvolvimento dos trabalhos *in vitro* com as espécies de Apiaceae.

Todos os procedimentos que envolviam as culturas *in vitro* ou seu estabelecimento, manipulação e propagação, foram efectuados cuidadosamente em condições de assepsia, em câmara de fluxo laminar vertical (fluxo de ar estéril vertical e constante). O interior da câmara e todo o material necessário aí colocado, à excepção obviamente do material biológico, foi previamente esterilizado por radiação ultra violeta durante 30 a 45 min.. O material de vidro e metal a utilizar nestas operações era envolvido em folha de alumínio e esterilizado a seco numa estufa a 180° C durante a noite. Antes de efectuar qualquer operação com o material vegetal e durante as manipulações, o material de metal (pinças e bisturis) era levado à chama, até ficar ruborizado, e arrefecido em água esterilizada. O material vegetal era manipulado no interior de placas de vidro de grande diâmetro que iam sendo substituídas com frequência. As sementeiras e as subculturas foram realizadas em frascos de culturas de vidro cobertos por tampas de polipropileno ou em tubos de culturas de vidro selados com rolhas de algodão e folha de alumínio. Cerca de 20 a 30 ml de meio de cultura, dependendo do tipo de explante,

era colocado nos recipientes para ser submetido à esterilização por calor húmido em autoclave (temperatura, pressão e duração das autoclavagens 121°C, 1 atm e 20 min., respectivamente). Para as culturas em meio sólido recorreu-se sempre ao meio MS base (Murashige e Skoog, 1962) com 2% (p/v) de sacarose e 0,8% (p/v) de agar. Relativamente aos fitoreguladores utilizados neste trabalho (BA e 2,4-D), a sua concentração foi variando conforme os diferentes ensaios sendo a adição efectuada previamente à esterilização do meio. O pH foi mantido dentro do valor referido para as culturas em meio sólido (entre 5,7 e 5,8). Todos os frascos foram colocados numa sala de cultura com fotoperíodo igual a 16 h seguido de 8 h no escuro. A energia radiante fotossinteticamente activa (PAR) variou de intensidade conforme o número de lâmpadas usadas e distância destas com as prateleiras. Apesar das tentativas de manter as intensidades luminosas constantes entre os ensaios, não é possível dar indicações claras de condições de luz únicas já que as culturas foram submetidas a alterações de PAR como consequência de um incêndio ocorrido na sala de culturas *in vitro* do departamento de Biologia. No início dos trabalhos, as culturas foram deslocadas para outra sala no departamento, a sala de culturas de plantas disponível para as investigações na área de nematologia. A temperatura existente entre das salas de cultura variou entre 23 e 27° C (25 ± 2 °C).

2.1.1. Culturas *in vitro* de *L. angustifolia*

O material vegetal utilizado para todas as fases experimentais foi proveniente das culturas *in vitro* de rebentos caulinares de *L. angustifolia* previamente estabelecidas e mantidas no departamento de Biologia da Universidade do Minho desde 1998. Esta espécie já tinha sido alvo de estudo por parte de diversos investigadores que têm passado pelo laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade do Minho, tendo sido micropropagada, nos últimos anos, pelo Dr. Paulo Sérgio Braga e por mim própria, no âmbito do estágio curricular da Licenciatura de Biologia Aplicada. Desde 2006 as culturas *in vitro* de alfazema têm estado em manutenção recorrendo à micropropagação de rebentos caulinares em meio MS suplementado com BA (0,25 mg/l) e sob PAR de 30 a 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Porém, nos últimos meses, tinha-se vindo a constatar uma perda de vigor e capacidade de desenvolvimento das culturas, sendo cada vez mais notória a redução da resposta dos segmentos nodais à suplementação. Por esse motivo, neste presente trabalho, optou-se por introduzir algumas alterações da suplementação hormonal para estimular o desenvolvimento destas. Assim o

objectivo primário a atingir com esta espécie consistiam na estimulação do crescimento dos rebentos caulinares para estudos fitoquímicos e iniciar novas culturas de *calli*.

2.1.1.1. Micropropagação e Callogénese

No decorrer do que vinha a ser constatado para a micropropagação de rebentos caulinares de *L. angustifolia*, considerou-se que o desenvolvimento dos explantes nodais, contendo dois meristemas axilares adjacentes, não era satisfatório, designadamente em termos de crescimento linear, números de nós ou número de folhas. Por outro lado, poucos explantes conseguiam responder à suplementação de BA 0,25 mg/l que outrora se revelara benéfica para a obtenção de rebentos caulinares. Assim, parte dos explantes nodais passaram a ser subcultivados em meio MS com concentrações de BA distintas da inicial: 0,50 mg/l e 1,25 mg/l. Dois conjuntos de frascos (doze frascos por ensaio com quatro explantes nodais por frasco) foram colocados sob intensidade luminosa de 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ durante cinco semanas. Passado esse período de cultura registou-se o número de explantes que reagiram, o tipo de resposta, o aspecto dos rebentos caulinares e a formação ou não de tecido indiferenciado. Posteriormente os rebentos caulinares cultivados em BA 0,5 mg/l foram conservados e multiplicados nesse meio ao longo das seguintes subculturas enquanto os rebentos caulinares obtidos com em BA 1,25 mg/l, devido à resposta insatisfatória que apresentaram, foram transferidos para meio MS contendo uma menor concentração de BA (1 mg/l).

Paralelamente, no intuito de iniciar culturas de *calli*, isolaram-se segmentos distais de folhas largas de plântulas crescidas em Meio MS com BA (0,25 mg/l). Os explantes foram distribuídos por dez frascos em número de dois por frasco num total de vinte explantes. Cada frasco continha 20 ml de meio MS sólido com a 2% (p/v) de sacarose e uma suplementação hormonal com concentrações equivalentes de auxina e citocinina (2,4-D e BA a 0,25 mg/l). Os frascos foram deixados sob intensidade luminosa baixa entre de 15 a 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ durante 8 semanas embora à quinta semana já se tivesse procedido ao registo dos resultados. Na primeira subcultura das massas de *callus* manteve-se a suplementação hormonal e a composição do meio MS mas procedeu-se ao aumento da concentração de sacarose de 2 para 3% e à incorporação de ácido ascórbico (Vitamina C) ao meio de cultura numa concentração de 25 mg/ml. As repicagens das culturas de *calli* para meio fresco foram realizadas entre a quinta e sexta semana de culturas. É de referir que no decorrer da segunda

subcultura surgiu um incêndio na sala das culturas *in vitro*, o que obrigou à deslocação de todas as culturas em manutenção para a outra sala de condições controladas embora de intensidade luminosa (PAR) diferentes. A 3ª subcultura foi providenciada antes do previsto, no decorrer da quarta semana devido às modificações notórias que as culturas de *calli* manifestaram. Na tentativa de estimular o crescimento dos *calli* e reduzir sinais de oxidação transferiram-se os *calli* sem efectuar cortes de bisturi directamente para novo meio MS sólido suplementado com 2,4-D (0,5 mg/l) e BA (0,25 mg/l). O ácido ascórbico foi também adicionado numa quantidade duas vezes superior ao utilizado anteriormente (50 mg/l).

2.1.2. Culturas *in vitro* de plantas da família Apiaceae

2.1.2.1. Estabelecimento das culturas: Desinfecção, germinação e crescimento de *F. vulgare* var. *vulgare*, *A. graveolens* e *P. crispum*

O estabelecimento de culturas *in vitro* de *Foeniculum vulgare* foi iniciado recorrendo às sementes maduras de funcho silvestre colhidas no mês de Outubro de 2008 a partir de uma população crescida espontaneamente em São Paio de Merelim (Braga) e cujas características se aproximam de *F. vulgare* var. *vulgare*. Após a colheita das umbelas maduras ainda frescas, colocaram-se as infrutescências, suportando os frutos esquizocarpos ainda verdes, a secar para terminar o amadurecimento destas. Cerca de um mês depois, os frutos, contendo as sementes, foram separados das umbelas para proceder à uma primeira tentativa de desinfecção e inoculação em meio de cultura:

a) Os frutos foram lavadas e humedecidas em água morna durante umas horas para promover a hidratação das sementes e propiciar uma germinação mais rápida. Antes de proceder a uma lavagem em etanol a 70% (cerca de cinco min.), as sementes foram colocadas em água com Tween® 20 e agitadas durante cinco min.. Posteriormente, os frutos foram lavados e colocados a desinfectar durante quinze min. em lixívia comercial com 4% de cloro activo. Antes de proceder à inoculação das sementes, realizaram-se quatro lavagens vigorosas em água esterilizada. Os frutos esterilizados foram distribuídos por quarenta e cinco tubos de cultura contendo meio MS simples com 2% de sacarose, sem fitoreguladores, cobertos por rolhas de algodão e folhas de prata.

b) No início do mês de Dezembro repetiram-se os procedimentos de desinfecção, introduzindo algumas alterações. Os frutos de funcho foram deixados em água cerca de 24 horas e colocadas numa

solução contendo umas gotas de Tween® 20 durante trinta min.. Efectuaram-se várias passagens em etanol e água e uma desinfecção em hipoclorito (lixívia comercial) a 4% de cloro activo, não menos de quinze min.. Após lavagem, as sementes foram distribuídas por vinte e cinco frascos de cultura contendo ½ meio MS (com metade dos macro e micronutrientes mas concentrações normais de vitaminas e aminoácidos). Os frascos foram colocados na sala de culturas sob intensidade luminosa de 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ sob temperatura e fotoperíodo igual ao que foi referido no início desta secção no ponto 2.1. A partir desta segunda tentativa foi possível determinar a percentagem média de germinação sete semanas após a inoculação. Esta consistiu numa contagem do número de sementes por frasco que teriam germinado relativamente ao número de sementes germinado e à determinação da média final (com desvio padrão) para os vinte e cinco frascos.

Quando as plântulas atingiram um tamanho razoável, isto é entre seis a sete semanas após a germinação, procedeu-se à transferência destas para novos frascos com meio MS completo sem fitoreguladores. Para facilitar as operações e o transplante as folhas foram seccionadas e removidas evitando danificar o meristema apical. Deste modo, as plântulas puderam ser transplantadas inteiras (duas por frasco) tentando mergulhar as suas raízes, ainda relativamente pouco desenvolvidas, no meio de cultura. Cerca de 6 semanas depois repetiu-se o procedimento, desta vez com o cuidado de enrolar e agregar melhor as raízes que já se apresentavam mais longas e ramificadas. Nesse momento, parte das plantas foram retiradas e processadas para o estudo fitoquímico dos OEs enquanto as restantes foram preservadas e subcultivadas garantindo a continuidade às culturas. As culturas têm sido mantidas nas mesmas condições sob intensidade luminosa de 60-80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. De seis em seis semanas, as plantas são transferidas para novo meio procurando sempre manter a integridade da planta do mesmo modo que foi descrito acima.

No estabelecimento de culturas *in vitro* de *A. graveolens* optou-se por adquirir sementes seleccionadas e distribuídas por empresas especializadas e colocadas à venda num estabelecimento comercial de distribuição de artigos de jardinagem e horticultura.

Cerca de 1 g de frutos foram colocados a hidratar sob agitação vigorosa numa solução de Tween® 80 durante 2h. Após lavagem com água os frutos foram colocados em água com umas gotas de lixívia durante 2h. Depois de lavados, os frutos foram deixados em água durante uma noite para hidratar. No dia da desinfecção foram aplicados vários tratamentos:

Procedeu-se a uma lavagem em etanol a 96% durante 5 min., seguida de duas ou três lavagens com água desionizada esterilizada. De seguida, as “sementes” foram colocadas em lixívia comercial com 3,5% de cloro activo durante 15 min. e lavadas várias vezes em água desionizada esterilizada. Os frutos desinfectados foram distribuídos por trinta e três tubos de cultura num número igual ou superior a sete sementes/tubo contendo 20 ml de meio $\frac{1}{2}$ MS sólido (com metade dos macro e micronutrientes) e colocados na sala de culturas alternativa (nematologia) a uma temperatura elevada de 24-25°C e uma intensidade luminosa entre 70 e 90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. A rápida resposta germinativa permitiu que à quarta semana se efectuasse o registo do número de sementes germinadas por tubo, de modo a avaliar a percentagem média de germinação tal como descrito para a germinação do funcho.

Entre a sexta e sétima semana após a germinação, procedeu-se, à transferência das plântulas de Aneto para frascos contendo meio MS completo. Antes de colocar as plântulas e introduzir as raízes no meio, procedeu-se ao seccionamento das folhas de modo a criar espaço no interior do frasco, facilitar o manuseamento e evitar assim a ocorrência de contaminações. Após seis semanas de desenvolvimento, parte das culturas foram utilizadas para extracção de OE, tendo as restantes sido transferidas para frascos contendo 20 ml de meio fresco. Todavia, não foi possível seguir exactamente os mesmos procedimentos que para o funcho devido às modificações de morfologia que as culturas de aneto foram sofrendo desde a primeira subcultura. Para algumas plantas (cerca de quarenta) foi possível manter a sua integridade, seccionar somente as folhas mais antigas e colocar no meio. Porém, para outros exemplares foi necessário proceder ao isolamento de explantes nodais e à separação de um explante basal que desenvolvera múltiplas folhas e raízes. Assim foram seccionados e inoculados para o meio MS sólido sem fitoreguladores trinta e sete explantes nodais (repartidos em treze frascos) e dezoito explantes basais (distribuídos em dez frascos). As culturas continuaram em desenvolvimento nas mesmas condições de cultura sendo transferidas para novo meio e isolados novos explantes quando considerado necessário. As alterações morfológicas foram acompanhadas por registo fotográfico ao longo do tempo.

O estabelecimento de culturas *in vitro* de *Petroselinum crispum* foi efectuado com a mesma abordagem de desinfectação de frutos e inoculação para germinação *in vitro* descrita para *Anethum graveolens*. Recorreu-se a uma amostra de frutos maduros colhidos em Agosto de 2008 na fase da

infrutescência de salsa cultivada. As mesmas infrutescências foram igualmente utilizadas para extracção de OE.

a) Numa primeira tentativa as sementes (frutos esquizocarpos) foram tratadas com:

- Solução com Tween® 20 durante 5 min.;
- Lavagem em água e depois em etanol a 96% durante 5 min.;
- Lavagem em água estéril;
- Desinfecção em lixívia comercial com 3,5% cloro activo durante 10 min.;
- Múltiplas lavagens em água desionizada estéril.

Os frutos foram distribuídos em frascos de cultura com meio MS simples. Algumas sementes sobraram e foram colocadas em vaso com terra para comparar a resposta germinativa. Porém, o desenvolvimento de contaminações fúngicas foi generalizado em todos os frascos de cultura.

Tendo em conta que o ensaio deveria ser repetido mas que já não havia nenhuns frutos de salsa disponíveis do genótipo anterior, ponderou-se a aquisição das “sementes” de *Petroselinum crispum* numa loja distribuidora, tal como fora efectuado para o *Anethum graveolens*.

b) Assim, numa segunda tentativa, cerca de 1g de sementes (frutos esquizocarpos) foram colocados a hidratar em água morna durante aproximadamente 24h. No dia da desinfecção foram aplicados os seguintes tratamentos:

- Lavagem em Solução com Tween® 20 sob agitação vigorosa para actuar como detergente e permitir uma melhor penetração das soluções nas fendas;
- Lavagem em água com um pouco de lixívia (30 min.) para uma primeira desinfecção superficial;
- Lavagem em etanol 96% durante 15 min. com agitação para abrir as fendas que rodeiam os frutos e aumentar a superfície de exposição ao agente desinfectante;
- Duas Lavagens em água desionizada estéril;
- Desinfecção em lixívia comercial com 3,5% de cloro activo durante 15 min.;
- Três a quatro lavagens em água estéril para remover os restos de cloro activo.

Os frutos esterilizados foram distribuídos em número de oito a doze por tubo de cultura contendo 20 ml de meio MS sólido com metade dos macro- e micronutrientes. O conjunto dos vinte e sete tubos foi mantido na sala de culturas alternativas (nematologia) sob intensidade luminosa PAR entre 80 a 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e temperatura 24-25° C. Embora, desta vez, não tenham surgido quasquer contaminações também não se verificou nenhum caso de germinação mesmo 2 meses após o início da tentativa de cultura seminal.

c) As dificuldades ocorridas no processo de germinação levaram à necessidade de estudar um pouco mais os factores envolvidos na germinação da salsa antes de proceder a uma terceira tentativa.

Após a leitura de publicações sobre estudos de germinação nesta espécie (Rodrigues *et al.*, 2008; Thomas, 1996) e espécies da mesma família (Robinson, 1954) introduziram-se várias modificações na metodologia usada até então:

Os frutos de salsa foram colocados em água desionizada para absorção desta durante 48h em vez das 24h aplicadas nas tentativas anteriores. Preparou-se e distribui-se 200 ml de agar a 0,8% (p/v) em placas de *Petri* estéreis em substituição ao meio MS em frascos de cultura. As sementes hidratadas foram lavadas com Tween® 20 alguns minutos, colocadas em etanol a 70% durante mais de 15 min. e desinfectadas com lixívia comercial (3,5 % de cloro activo) durante 15 min.. Entre cada operação teve-se o cuidado de passar as sementes por água desionizada estéril. Estas foram distribuídas por onze placas de *Petri* agarizadas contendo um disco de papel de filtro e 3 ml de uma solução de nitrato de sódio (NaNO_3) a 0,2% (p/v), ambos esterilizados por autoclavagem. As placas foram seladas com parafilme e colocadas a incubar na sala de ambiente controlado de nematologia a 24 -25°C numa zona sem iluminação directa.

Após as primeiras duas semanas efectuou-se um registo do número de sementes germinadas mais precocemente. Finalmente às cinco semanas contabilizou-se o número total de sementes germinada sobre o número total de semente por placa para determinar a percentagem média de germinação (com desvio padrão). As plântulas que germinaram foram retiradas das placas de *Petri* e transferidas, em conjuntos de três, para frascos de cultura contendo 20 ml de meio MS sólido. Os frascos foram colocados sob intensidade luminosa compreendida entre 70 e 90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e temperatura 24-25°C. Quando estas atingiram um tamanho razoável foram removidas as folhas maiores e e as plantas transferidas para meio MS novo.

Paralelamente, aos ensaios de germinação efectuaram-se desinfecções de material vegetal de salsa adulta cultivada em vasos como uma segunda estratégia de iniciação de culturas *in vitro* para resolver o obstáculo da germinação. Diversos tipos de explante provenientes de plantas adultas foram seleccionados para desinfecção (Figura 13 a, b, c, d, e e, respectivamente). Os segmentos reagiram relativamente bem ao processo de desinfecção, embora nalguns casos tenha sido necessário seccionar novamente as extremidades removendo os tecidos mais afectados pelo hipoclorito. Todos os segmentos foram colocados em meio MS base com uma suplementação de 2,4-D a 0,25 mg/l.

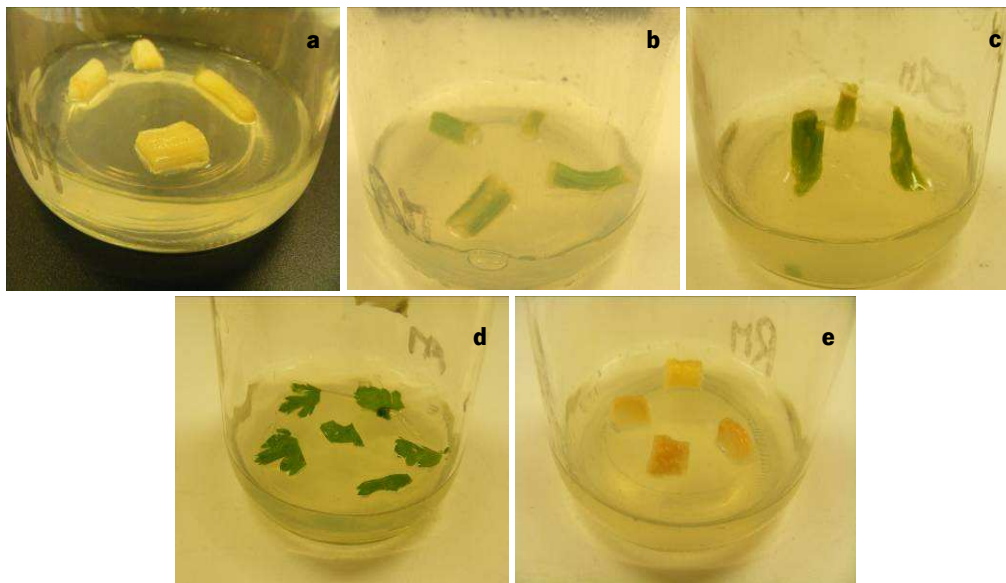


Figura 13. Fotografia dos diferentes tipo de explantes seccionados de plantas de *P. crispum* adulta e desinfectados na tentativa de estabelecer culturas *in vitro* desta espécie. a) Segmentos do caule principal ao qual foi removida a epiderme; b) Segmentos de pecíolos; c) Segmentos de meristemas laterais isolados das axilas dos pecíolos; d) Segmentos de folhas; e) Segmentos de medula de raízes principais.

2.1.2.2. Indução de *Hairy roots* em espécies de Apiaceae por infecção com *Agrobacterium rhizogenes*

A transformação e indução de *hairy roots* de espécies da Família Apiaceae foi incluída neste programa de trabalho como uma abordagem biotecnológica adicional, pelo facto destas espécies acumularem quantidades razoáveis de constituintes de EO nas suas raízes. Assim, o estabelecimento de culturas de *hairy roots* por infecção com *Agrobacterium rhizogenes* foi a metodologia seleccionada pela sua simplicidade e facilidade de execução. A transformação foi levada a cabo com uma estirpe *wild type* de *A. rhizogenes* (A4) gentilmente disponibilizada pelo Doutor Franklin Gregory, do laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade do Minho. A cultura foi iniciada a partir de um stock de bactéria criopreservada a -80°C em 30% de glicerol. O inóculo foi adicionado a 200 ml de meio de cultura LB (Bertani, 1951) líquido e colocado a incubar a 28° C num agitador a 200 rpm. Após três dias de crescimento, a cultura de bactéria atingiu uma densidade óptica óptima (entre 0,5-0,8) estando pronta para aplicar o protocolo de infecção. Nos dias imediatamente anteriores à infecção (um a dois dias antes), foram isolados diversos explantes das culturas *in vitro* de funcho, aneto e salsa. Os

diferentes explantes de funcho (sessenta e dois segmentos de pecíolos), de aneto (cem segmentos de pecíolos e entre-nós) e de salsa (cento e quarenta e sete segmentos de pecíolos e folhas) foram preparados para a infecção, efectuando uma série de cortes superficiais. Estes foram distribuídos, em grupos individualizados para cada tipologia de explante, em placas de *petri* contendo meio MS base. No momento da infecção, 30 a 40 ml de suspensão bacteriana foram retirados em condições de assépsia e colocados a centrifugar a 5000 rpm durante 20 min. O *pellet* foi ressuspendido em água desionizada esterilizada e a suspensão vertida em placas de *petri* contendo cada tipo de explantes. Decorrido um período de 10 min. com agitação ligeira e contínua, os explantes foram retirados da suspensão e distribuídos novamente para as respectivas placas de meio MS. Estes foram co-cultivados durante cinco a seis dias na sala de culturas, findo os quais se procedeu à lavagem rigorosa dos segmentos em água esterilizada. Finalmente, os segmentos foram redistribuídos em novas placas de *petri* contendo igualmente meio MS base no qual fora previamente incorporado o antibiótico *Timentin* (mistura de *Ticarcillin* com clavulanato 15:1) numa concentração de 500 mg/l. Para cada espécie e cada tipo de explante foi sempre incluído um grupo controlo que obviamente não foi sujeito á infecção mas que foi igualmente transferido para o meio MS com antibiótico. Os resultados foram registados cerca de seis semanas após a infecção.

2.2. Composição dos OEs produzidos *in vivo* e *in vitro* por *L. angustifolia*, *F. vulgare* var. *vulgare*, *A. graveolens* e *P. crispum* ssp. *neapolitanum*

No âmbito geral do trabalho, a caracterização dos OEs obtidos *in vivo* e *in vitro* constituiu indubitavelmente a tarefa de maior interesse, exigindo porém maior dedicação. Assim, pretendeu-se caracterizar os diferentes OEs extraídos das quatro espécies em estudo, não só em termos de perfis fitoquímicos mas igualmente quanto à possível variabilidade existente entre diversas tipologias de material, amostras do mesmo tipo e/ou culturas diferentes, comparando os OEs produzidos *in vivo* e em condições controladas (*in vitro*).

2.2.1. Origem, tipologia e amostragem do material

Das quatro espécies estudadas, a *Lavandula angustifolia* foi a única espécie não pertencente à família Apiaceae a ser incluída no estudo fitoquímico dos OEs, pelo facto desta ser uma planta aromática muito produtiva com algumas potencialidades no combate aos insectos, nomeadamente como repelente. Efectuou-se uma colheita dos eixos florais em plena floração a partir de arbustos de alfavema com sete anos de idade cultivadas num terreno experimental em Braga (figura 14).



Figura 14. Fotografia de um arbusto de *Lavandula angustifolia* em plena floração no mês de Agosto com hastres compridas suportando espigas florais maduras.

A extracção foi realizada por hidrodestilação, em duplicado e os OEs puros recolhidos em *vials* distintos (tabela 5). A abordagem fitoquímica nesta espécie foi menos aprofundada do que nas espécies de Apiaceae visto que esta tinha feito parte de um estudo anterior, desenvolvido no decorrer do estágio e relatório da licenciatura (Sousa, 2006). Neste presente trabalho, foram definidos os rendimentos e composição das amostras de OE extraídos em volumes consideráveis para a realização de ensaios de actividade anti-insecto.

No caso particular de *Foeniculum vulgare* (funcho) optou-se por não direccionar os estudos para as variedades mais comuns cultivadas e de maior interesse agro-alimentar (*Foeniculum vulgare* Miller subsp. *Vulgare* var. *dulcis* e *F. vulgare* subsp. *Vulgare* var. *azoricum*). Tendo em conta que o funcho silvestre ou espontâneo é muito abundante em Portugal, nomeadamente no Norte do país onde algumas populações já foram caracterizadas morfológicamente (Barbosa *et al.*, 2007), considerou-se que a colheita de pequenas amostras de espécimes crescidos em terrenos baldios seria uma oportunidade interessante de procurar um quimiótipo isolado com um perfil químico ainda não caracterizado. Contudo, de forma a reduzir a variabilidade intra específica e fitoquímica, procurou-se um local em que existisse uma população isolada, suficientemente abundante e a mais homogénea possível em termos de morfologia, altura e estado de maturação. Esses foram os requisitos principais para a escolha do material vegetal, sendo simultaneamente uma prioridade minimizar as consequências das nossas amostragens na continuidade da população escolhida. Assim, com a ajuda da Dr^a Liliane Gomes, identificou-se um local adequado à colheita nas imediações da cidade de Braga, Freguesia de São Paio de Merelim, num terreno arenoso na margem do rio Cávado (41° 36' 04.21" N; 8° 26' 50.25" O). Foi efectuado o registo fotográfico do local e das plantas *in loco* assim como das características morfológicas mais pormenorizadas (figura 15) de modo a identificar a espécie.

Os OEs foram obtidos por hidrodestilação das umbelas colhidas na fase de infrutescência em diferentes períodos (espaçados de seis semanas). Também se procedeu ao isolamento dos OE a partir de ramificações inteiras (folhas, pecíolos e caules) em Novembro 2008 e Março 2009. A descrição das biomassas utilizadas e dos pesos secos estão resumidas na tabela 5.

No que diz respeito ao OEs de *Petroselinum crispum* efectuou-se o estudo *in vivo* com material biológico de duas origens distintas (tabela 5). Numa primeira fase, foram colhidas umbelas frescas de salsa (figura 16, à esquerda) provenientes de culturas em terreno particular em pleno período de

infrutescência para isolamento e caracterização do OE. Apesar da origem do material vegetal não estar certificada, confirmou-se como sendo da subespécie *neapolitanum*, comumente usada em Portugal e designada como salsa Portuguesa, após comparação com os exemplares cultivados na empresa *Ervas Finas* de Vila Real.



Figura 15. Imagem fotografica das diferentes tipologias de material vegetal colhido a partir de exemplares de funcho silvestre identificado como *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* colhido em S. Paio de Merelim, Braga (fotos cedidas por Liliane Gomes).



Figura 16. Fotografias da tipologia de material vegetal utilizado na extracção de óleos essenciais de *Petroselinum crispum* (salsa). À esquerda: Umbelas com infrutescências ainda verdes. À direita: exemplar crescido e mantido em vaso para consumo próprio.

Mais tarde, foi efectuada uma colheita de folhas e caules em plantas jovens resultantes de sementeira a partir das anteriores (figura 16, à direita) e crescidas do mesmo local. Por outro lado, foi também possível extrair e analisar o OE acumulado em folhas e caules de plantas cultivada pela empresa *Ervas Finas*, em Vila Real. Neste caso, foram efectuadas colheitas das partes aéreas das plantas (folhas, caules foliares, caule e rebentos) no local em Dezembro de 2008 e posteriormente em Maio 2009.

É importante realçar que os OEs de alfavema, funcho e salsa foram extraídos tanto no intuito de obter volumes de OE puro, para utilizar ao longo do estudo de actividade biológica, como para realizar as análises cromatográficas para identificação e quantificação dos respectivos constituintes. Para tal, era imprescindível realizar uma diluição de uma pequena fracção das amostras num solvente compatível, neste caso o *n*-hexano. Assim, quando os volumes de OE recolhidos a partir de cada amostra o permitiam, era realizada uma diluição (proporção de volumes de 1:11) utilizando 50 ou 100 µl de OE puro em 500 ou 1000 µl de uma solução de 5- α -colestano (1mg/ml) em hexano para dar seguimento à respectiva análise cromatográfica. A introdução de um padrão interno iria possibilitar, à posteriori, uma aproximação à quantificação absoluta dos constituintes.

Tabela 5. Dados relativos às colheitas de material vegetal de *L. angustifolia* (alfavema), *F. vulgare* var. *vulgare* (funcho amargo), *A. graveolens* (aneto) e *P. crispum* spp. *neapolitanum* (salsa de folha lisa).

	<i>L. angustifolia</i>	<i>F. vulgare</i>				<i>A. graveolens</i>	<i>P. crispum</i>			
Tipologia material	Eixos florais	Umbelas		Folhas e caules		Folhas e caules	Umbelas	Folhas e caules	Folhas, caules e rebentos	
Datas de recolha (dia, mês e ano)	21 Jul 2008	10 Out 2008	23 Nov 2008	14 Out 2008	11 Mar 2009	18 Maio 2009	25 Ago 2008	8 Mar 2009	10 Dez 2008	18 Maio 2009
Peso fresco hidrodestilado (g)	110,3	111,9	100,5	128,0	250,0	46,10	84,99	284,0	150,0	225,0
	114,2								163,8	145,0
Peso seco ^a (g)	38,73	37,73	36,88	19,58	26,63	5,90	33,20	45,5	23,4	33,0
	40,01								25,6	29,5

^a A determinação da biomassa seca efectivamente sujeita a hidrodestilação não foi obtida por pesagem directa mas sim por extrapolação procedendo à liofilização de amostras separadas nas mesmas condições de hidratação no momento da hidrodestilação.

No caso de *Anethum graveolens* (figura 17), não foi possível realizar-se um estudo tão aprofundado do OE produzido pela planta, comparativamente com as restantes espécies. A maior dificuldade em obter material desta espécie levou inevitavelmente à restrição dos estudos inicialmente

programados, especialmente no que toca aos ensaios larvicidas. Porém, com a colaboração da Eng^a Graça Soares (Empresa *Ervas finas*) que gentilmente nos cedeu uma amostra, foi conseguida uma caracterização do OE acumulado nas folhas e caules da planta (tabela 5). O aneto, ainda jovem e produzido em modo biológico, encontrava-se em cultivo na quinta da empresa há cerca de três meses. O OE foi igualmente extraído por hidrodestilação da biomassa fresca mas não permitiu ser isolado no seu estado puro devido ao volume demasiado reduzido que se conseguiu recolher no processo de extracção. Assim, para esta amostra *in vivo* procedeu-se à adição de 1ml de hexano contendo 1mg de padrão interno ainda durante a hidrodestilação. Por esse motivo, não foi possível determinar o rendimento em OE.



Figura 17. Fotografia das partes vegetativas de aneto jovem (*Anethum graveolens*) utilizadas para extracção do óleo essencial e análise química. (imagem extraída do sitenaturehills.com).

Para além do estudo da biossíntese e acumulação de OEs nestas espécies em condições de cultivo normal em solo (*in vivo*), procedeu-se igualmente a uma abordagem fitoquímica dos OEs produzidos pelas respectivas culturas *in vitro*. Como foi referido na secção 2.1., procedeu-se ao estabelecimento de culturas para cada uma das espécies em condições de assepsia em meios de cultura de composição definida para, após um determinado período de crescimento das plantas, extrair o respectivo OE. As biomassas utilizadas nas hidrodestilações e as idades das plantas encontram-se resumidas na tabela 6.

Tabela 6. Dados relativos às amostragens de culturas *in vitro* de *L. angustifolia* (alfazema), *F. vulgare* var. *vulgare* (funcho), *A. graveolens* (aneto) e *P. crispum* spp. *neapolitanum* (salsa).

	<i>L. angustifolia</i>	<i>F. vulgare</i>	<i>A. graveolens</i>	<i>P. crispum</i>
Tipologia material	Rebentos caulinares	Plantas inteiras	Plantas inteiras	Plantas inteiras
Idade da cultura	16 Semanas	12 Semanas	12 Semanas	12 Semanas
Peso fresco hidrodestilado (g)	6,50	4,51	12,00	7,80
Peso seco^a (g)	1,03	0,57	0,73	0,98

^a O peso seco das biomassas frescas hidrodestiladas foi determinado por extrapolação após a secagem por liofilização de uma amostras do mesmo material reservadas para o efeito.

Todas as amostras de material vegetal destinadas à extracção de OE foram colhidas e seleccionadas com cuidado para pesagem e hidrodestiladas no próprio dia ou na manhã seguinte ao dia de colheita. Tendo em conta que todo o material se encontrava fresco no momento da extracção, foi necessário reservar e pesar uma ou mais amostras de cada tipo de material, no mesmo momento que era processada a amostra a hidrodestilar. Depois da congelação, as amostras eram sujeitas a liofilização (Freeze dryer B.Braun Chist Alpha L-1) durante pelo menos três dias. A relação existente entre o peso fresco inicial das amostras e os respectivos pesos secos permitiram determinar por extrapolação o peso seco aproximado das amostras sujeitas a hidrodestilação. A liofilização tem-se revelado eficaz na conservação dos aromas relativamente às plantas frescas (Diáz-Maroto *et al.*, 2002). Assim, este método de desidratação foi considerado mais adequado para uma determinação criteriosa da biomassa seca, comparativamente à secagem em estufa. Para o aneto já foi demonstrado que a liofilização permite uma melhor conservação dos constituintes totais relativamente à secagem ao ar (Huopalahti e Kesälahti, 1985). Porém, relativamente à salsa, Diáz-Maroto e colaboradores (2002) constataram que a perda de constituintes ocorria na mesma medida nas secagens por liofilização ou em forno a 45°C. Embora, a perda de voláteis no processo de secagem possa ser mais ou menos significativa dependendo das espécies e da natureza dos constituintes, qualquer processo de aquecimento do material vegetal é propício à indução de alterações químicas nos constituintes (reações de oxidação, hidrólise, etc.) e formação de artefactos (Diáz-Maroto *et al.*, 2002). Visto que se pretendia uma conservação de amostras secas para estudos futuros, procurou-se aplicar esta metodologia de liofilização em todas as amostras de modo a atenuar possíveis modificação pós-colheita na composição fitoquímica.

2.2.2. Extracção dos OEs

Para extrair a fracção volátil das plantas em estudo recorreu-se a uma das técnicas mais utilizadas: a hidrodestilação. Este método prático, fácil e menos dispendioso revela-se bastante adequado para a grande maioria das plantas. O extracto obtido por este método ou por arrastamento de vapor de água (*steam distillation*) é exclusivamente designado de Óleo Essencial.

Antes de iniciar as extracções procedeu-se à determinação do peso fresco da biomassa a hidrodestilar assim como das pequenas amostras para uma determinação posterior do respectivo peso seco por liofilização (aspectos já referido na secção anterior). À excepção dos eixos florais de *L. angustifolia* e das infrutescências de *F. vulgare* e *P. crispum*, todos os restantes materiais foram grosseiramente seccionados antes de serem colocados no balão do hidrodestilador de tipo Clevenger. Os volumes de água desionizada que foram adicionados variaram entre 300 ml a 1,5l dependo, em cada caso, da quantidade/volume da biomassa e tamanho do balão. O tempo de extracção variou entre 1h a 2h30 dependendo do tipo de material, da quantidade de água e material no balão. Considerou-se que no caso das biomassas utilizadas e do tipo de material usado (fresco, jovem, tenro e relativamente fino) esta duração seria suficiente à extracção da maioria dos compostos voláteis. No final, o OE recolhido na bureta do hidrodestilador era transferido para um *via*/devidamente rotulado. No caso particular dos OEs puros extraídos para utilização em bioensaios sem recorrer a solventes, procedeu-se à medição do volume e peso do OE para posterior determinação do rendimento em OE (g de OE/g de peso seco de biomassa e/ou ml de OE/g peso seco de biomassa). Quando foi possível, registou-se o volume de OE acumulado na bureta. De seguida o OE era devidamente separado da fase aquosa com uma pipeta de *Pasteur* e pesado no interior de um *via*/previamente tarado.

No caso dos OEs provenientes de culturas *in vitro* não foi possível avaliar os rendimentos por pesagem ou por leitura directa do volume de OE devido à reduzida quantidade de biomassa utilizada na hidrodestilação e à necessidade de adicionar solvente (hexano) para possibilitar a extracção e recolha dos OEs. Geralmente, nestes casos, na fase inicial da hidrodestilação era adicionado 1 ml de uma solução padrão de 5- α -colestano em hexano numa concentração 1 mg/ml (ou 0,5 ml de hexano contendo 0,5 mg de padrão). A introdução de quantidades conhecidas de 5- α -colestano como padrão interno contribuiu para uma aproximação à quantificação do teor absoluto dos compostos aquando da análise quantitativa do OE. O pequeno volume de hexano adicionado permitia aumentar a eficiência da extracção fazendo com que os compostos arrastados com o vapor de água fossem retidos neste

solvente. Todos OEs, puros e diluídos, foram armazenados a -20°C até serem analisados e/ou utilizados em ensaios de actividade biológica.

2.2.3. Análise quantitativa e qualitativa dos constituintes de OEs

Neste trabalho experimental em que se pretendia caracterizar a composição dos OEs extraídos recorreu-se ao método analítico e cromatográfico mais adequado para a análise de compostos de natureza volátil: a cromatografia gasosa (GC). As análises de GC foram realizadas num cromatógrafo Perkin Elmer, Autosystem XL equipado com FID e coluna capilar em sílica fundida com 30 metros de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, sendo a fase estacionária do tipo DB-5 (5% fenil, dimetil polissiloxano). O hidrogénio foi utilizado como gás de arrastamento na coluna sob uma pressão aproximada de 12,5 Psi. As temperaturas do detector FID e do injector foram definidas para os 300° C e o injector de tipo *split/splitless* apresentava uma repartição do fluxo na razão de 1:13. As análises cromatográficas decorriam durante 90 min. seguindo o programa de temperatura crescente (3° C/minuto) com início aos 60° C e termino aos 285° C onde se mantinha constante por 15 min. Os volumes de OEs injectados variaram conforme as amostras, dependendo se se tratava de óleos obtidos a partir de material vegetal crescido *in vivo* ou *in vitro* (0,3-0,5 µl). Cada amostra foi injectada pelo menos três vezes nestas mesmas condições e com o apoio do programa Turbochrom da Perkin Elmer obtiveram-se réplicas dos relatórios analíticos onde cada pico estava associado a um tempo de retenção e a um valor da área do pico obtido por normalização.

A quantificação relativa passou pela determinação da percentagem real da área de cada pico (composto), obtida por uma cálculo de correcção da área total após subtracção das áreas correspondentes ao solvente, padrão interno (5 α -colestano) e outros picos correspondentes a artefactos e ruído de fundo.

A quantificação absoluta foi realizada graças à adição de uma quantidade conhecida do padrão interno (5 α -colestano) aquando da hidrodestilação ou posteriormente a esta quando se tratava de OE puro. Extrapolou-se a quantidade de cada composto por intermédio da razão entre as áreas dos picos dos compostos e a área respectiva ao 5 α -colestano tendo em conta também a sua concentração. Assim para cada uma das três ou mais réplicas de relatórios cromatográficos foi possível especificar o teor de cada constituinte, isto é, o teor relativo (%) e determinar, por aproximação, o teor absoluto

expresso em µg/g de peso seco. Posteriormente o tratamento dos dados para cada amostra consistiu na determinação dos teores médios de cada composto e apresentação do respectivo erro associado, relativo à precisão do método cromatográfico em questão.

A identificação dos constituintes dos OEs foi efectuada com base em dados das respectivas análises por GC e por GC-MS. O cruzamento simultâneo dos dados recolhidos pela análise espectrométrica das amostras (espectros de massa obtidos para cada picos) e pela determinação dos Índices de Retenção de Kovats (KI) permitiu chegar à identificação inequívoca da maior parte dos compostos. O cálculo do KI para determinado composto constitui um parâmetro importante para a sua identificação. Em muito casos foi possível confirmar a identificação dos compostos tendo por base a comparação dos respectivos KI com os publicados em artigos (para colunas com fases estacionárias equivalentes), de padrões conhecidos ou de misturas complexas já analisadas (Dob *et al.*, 2005; Santos-Gomes e Fernandes-Ferreira, 2001). Este critério de identificação é bastante fiável e reproduzível num dado tipo de coluna e para uma dada série homóloga de compostos. Os KI foram determinados em relação a uma série homóloga de *n*-alcanos co-injectados com as amostras de OE. Este método constitui um dos métodos mais usados na identificação de compostos de OE (Shibamoto, 1987). Os índices de Kovats KI foram determinados em co-injecções efectuadas no GC e GC-MS, recorrendo à seguinte fórmula linearizada (Shibamoto, 1987):

$$KI = 100n + \frac{t'R(x) - t'R(n)}{t'R(n+1) - t'R(n)}$$

Em que: $t'R(x)$, $t'R(n)$ e $t'R(n+1)$ são os tempos de retenção ajustados entre a substância X e os alcanos anteriores e posteriores com n e $n+1$ carbonos, respectivamente.

Contudo, a determinação e utilização dos KI não é suficiente por si só para uma identificação inequívoca. Esta tem de ser coerente com a identificação espectral, baseada na comparação das semelhanças dos espectros de massa obtidos pelo GC-MS, com os espectros de massa de padrões e/ou espectros de massa de compostos inequivocamente identificados, armazenados nas bibliotecas anexas ao software do GC-MS ou publicados em literatura científica credível.

Assim, cada amostra foi analisada uma vez, injectando volumes de OE que variaram entre os 0,3 e os 0,5 µl num Cromatógrafo Gasoso Thermo Trace GC Ultra acoplado a um detector de massas Thermo-Finnigan Q de tipo *ion trap detector* (ITD). A coluna instalada no aparelho apresentava uma

fase estacionária de características semelhantes à coluna do GC (coluna capilar em sílica fundida de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro, com fase estacionária tipo TR-5, i.e., 5% fenil, dimetilo polissiloxano). As temperaturas do injecto e da interface com a câmara de ionização foram de 300°C e 250°C, respectivamente. O Hélio (He) foi usado como gás de arrastamento sob um fluxo constante de 1,5 ml/min. A repartição de fluxo (*split*) na entrada da coluna foi equivalente a 1:13. O programa de temperatura aplicado foi exactamente igual ao definido no GC (60-285°C com incremento de 3°C/min). No interior da câmara de ionização (temperatura de 250°C) as moléculas foram sujeitas a uma corrente iónica de 1600 mV para formar vários iões de fragmentação que após serem detectados pelo ITD seriam ordenados em espectros de massa característicos em função da razão massa/carga (m/z) e abundância relativa. Os espectros obtidos foram comparados com espectros de referência organizados em bibliotecas digitais por consulta destas através da base de dados NIST integrada no software do GC-MS, *Excalibur 1.4. Thermo Electron Corporation*. Para um maior ajuste entre o espectro do composto a analisar e os espectros propostos, utilizaram-se várias abordagens comparativas (identidade/semelhança e pesquisa directa/reversa) com mais do que uma biblioteca (TR, GP, Wiley, Mainlib).

2.3. Estudo do efeito larvívoro de OEs de *L. angustifolia*, *F. vulgare* var. *vulgare*, *P. crispum* spp. *neapolitanum* contra *Anopheles atroparvus*

Após extracção e caracterização química dos diferentes OEs das plantas *in vivo*, realizadas no laboratório de Biologia Vegetal do Departamento de Biologia, Universidade do Minho (Braga), deu-se início à avaliação da respectiva actividade anti-insecto em mosquitos. Os ensaios foram realizados sob orientação do Professor Doutor José António Grácio e da Mestre Diara Kady Rocha na Unidade de Entomologia Médica situado nas instalações do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT da Universidade Nova de Lisboa).

Tendo em conta a limitação de tempo no âmbito de uma tese de mestrado, reduzida disponibilidade de extractos, dificuldade inerente à utilização de mosquitos, entre outras, considerou-se, que o estudo do efeito anti-insecto seria mais exequível e não menos interessante se efectuado em larvas de mosquito, um dos alvos preferenciais utilizados em estudos desta natureza (Rocha, 2005). O alvo biológico que foi disponibilizado pelo Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) para estes ensaios foi um mosquito do género *Anopheles* mais precisamente a espécie *Anopheles atroparvus*, pertencente ao complexo de espécie *Anopheles maculipennis*. O terceiro estágio larvar foi a fase de desenvolvimento do mosquito escolhida para este estudo.

2.3.1. Manutenção das colónias do mosquito alvo: *An. atroparvus*

Para este trabalho recorreu-se a uma colónia de *An. atroparvus* iniciada no IHMT há mais de uma década, a partir de imaturos de *An. atroparvus*, provenientes da região de Águas de Moura (Distrito de Setúbal). A colónia é mantida em laboratórios, designados de insectários, em condições monitorizadas de temperatura (26 ± 1 ° C), humidade relativa (70-75%) e fotoperíodo (13 horas de luz para 11 horas no escuro). Todos os mosquitos são retidos em grandes gaiolas designadas de gaiola mãe, pois nestas é que se realizam a refeição sanguínea das fêmeas e todo o ciclo gonotrófico (figura 18). A fase larvar do ciclo desenvolve-se em meio aquático, em tinas de plástico rectangulares contendo água da torneira que foi mantida à temperatura ambiente durante vários dias (figura 19). Todo o desenvolvimento em meio aquoso, desde o ovo até à emergência do mosquito, no final da fase de pupa, se realiza no meio aquático. Assim, as larvas são alimentadas diariamente com uma mistura de *Tetra Menu* e Bolacha Maria triturada em partes iguais. Quando as larvas passam à fase de pupa deixam de se alimentar, são

retiradas das tinas e colocadas em recipiente com água no interior da gaiola dos adultos a aguardar a emergência do mosquito.



Figura 18. Sistemas utilizados para a manutenção das colónias de mosquitos na Unidade de Entomologia Médica do IHMT. À esquerda: Gaiola dos mosquitos revestida a rede elástica com uma abertura (manga) no centro e uma cobertura húmida no topo. No seu interior encontram-se duas tinas com pupas prontas para eclodir. À direita: Conjunto de tinas cobertas por redes contendo larvas de *An. atroparvus* em estádios de desenvolvimento distintos.



Figura 19. Larvas vivas de *An. atroparvus* em cultura no 3º estágio do seu desenvolvimento. As larvas em fase L3 precoce e tardia co-existem na mesma tina de cultura. À Esquerda: Aspecto geral e densidade da população. À direita: Pormenor de algumas larvas no final da fase L3 (larvas maiores) em contraste com a fase L3 mais precoce (larvas pequenas).

Relativamente à alimentação dos mosquitos fêmeas, são providenciadas refeições sanguíneas pelo menos duas vezes por semana, essencial para a maturação ovárica e postura. Para tal, utilizam-se ratões vivos (*Rattus rattus*), provenientes do biotério do IHMT. Os ratos são previamente anestesiados por inoculação intra-muscular de *Rompun* 2% e *Imalgène* 1000 (1:2), sendo o volume final a injectar

determinado em função do peso do animal. Dentro da gaiola mãe é colocada um pequeno recipiente com solução de sacarose a 10% (p/v) embebido em papel de filtro para alimentação dos machos e das fêmeas (energia para o voo e manutenção). Geralmente a postura dos ovos ocorre nas 48 horas seguintes, numa placa de *petri* com água, colocada a disposição das fêmeas no interior da gaiola. Os ovos, são posteriormente transferidos para as tinas rectangulares, passam por um processo de eclosão, dando origem a larvas do 1º estágio. Em condições ideais de desenvolvimento a emergência dos primeiros mosquitos decorre em média duas semanas após a eclosão do ovo. A manutenção dos imaturos passa por lavagens regulares e mudanças de águas das tinas de modo a evitar desenvolvimento de fungos que comprometeriam o desenvolvimento larvar. No caso da recolha/separação de larvas ou pupas do meio esta é efectuada por captura dos indivíduos com uma pipeta de *Pasteur* de plástico com abertura larga. Por seu lado, a captura de mosquitos é realizada com um aspirador mecânico, conforme recomendações da OMS. A colónia é mantida em condições máximas de higiene evitando contudo a contaminação com detergentes agressivos que poderiam comprometer o desenvolvimento dos insectos.

2.3.2. Bio-ensaio

2.3.2.1. Plano experimental e previsão das necessidades

Tendo em conta a reduzida disponibilidade de tempo, quantidade de larvas no 3º estágio disponíveis e volume dos OEs, revelou-se indispensável efectuar uma estimativa das necessidades inerentes a cada ensaio, de modo a elaborar um planeamento ajustado (Tabela 7). Por outro lado, o reduzido volume disponível de alguns OEs levou a uma gestão ainda mais cuidada das quantidades requeridas considerando a amplitude de concentrações a testar e o número mínimo de réplicas necessárias (Tabela 8).

Perante as previsões efectuadas nessa fase inicial de planificação dos ensaios constatou-se que o número de larvas disponíveis (nos vários estádios) era ainda reduzido já que a colónia se encontrava numa fase de produção controlada. Para ampliar a colónia e obter um número elevado de larvas foi necessário aumentar o número de refeições sanguíneas por semana para proporcionar a oviposição. Prevvia-se então, a partir desse momento, cerca de sete a dez dias de desenvolvimento para

obter larvas no terceiro estágio. Por outro lado, o número de tinas de vidro disponíveis (capacidade 500 ml) não iria possibilitar a realização de ensaios simultâneos considerando que cada ensaio seria constituído por uma gama crescente de concentrações de quatro a cinco diluições distintas e um grupo controlo, replicados três vezes. Contudo a maior restrição estava relacionada com a quantidade de OE disponível para cada amostra. Conforme as previsões iniciais de aplicação de seis concentrações distintas em réplicas de quatro (incluindo o ensaio preliminar) teríamos de dispor de pelo menos de 3,2 ml de OE para cada amostra a testar. Embora isso não representasse um problema para alguns OEs, como o das flores de alfavaca ou de partes vegetativas de funcho silvestre, para outros este factor foi limitante. O OE das infrutescências de funcho silvestre não seria suficiente para aplicar na gama de concentrações apresentada (Tabela 8). Por outro lado, os OEs de Salsa, tanto o das infrutescências como o das partes vegetativas, não iriam possibilitar a aplicação para todas as concentrações em especial as mais elevadas, tendo em conta as três réplicas a realizar. A limitação temporal também foi uma constante no planeamento estando intrinsecamente ligada aos factores descritos anteriormente. A existência de cinco amostras distintas de OE a testar, o período de tempo necessário para cada ensaio larvicida (48h) e a reduzida disponibilidade de alguns OE, que certamente não iria permitir repetições, foram condicionantes tidas em conta do princípio ao fim do desenvolvimento dos trabalhos.

Tabela 7. Previsões das necessidades inerentes à realização de bio-ensaios para testar o efeito larvicida de óleos essenciais nas larvas de *An. atroparvus*.

	Ensaio prévios	Ensaio finais	Total
Nº de OEs diferentes a testar	4	4	...
Nº de concentrações mais o controlo	6	5	...
Nº de réplicas	1	3	4
Nº de larvas /recipiente	25	25	25
Nº larvas para testar cada OE	150	375	525
Total de larvas necessárias	600	1500	2100
Nº total de recipientes	24	60	...
Volume de água por recipientes (ml)	250	250	250
Volume total de água desionizada (ml)	6000	15000	21000

Tabela 8. Previsões das possíveis concentrações a testar e dos volumes totais de cada óleo essencial necessários para a realização de 4 réplicas por ensaio.

Concentrações (ppm ou µl/L)	Volumes de OE/ 250 ml água (µl)	Nº de ensaios	Volume Total OE (ml)
50	12,5	4	0,05
100	25	4	0,10
200	50	4	0,20
400	100	4	0,40
800	200	4	0,80
1600	400	4	1,60
Total	787,5	24	3,15

2.3.2.2. Ensaios preliminares e otimização da metodologia

Antes de iniciar os ensaios de bio-actividade propriamente ditos, considerou-se imprescindível a realização de um ensaio prévio dentro de uma gama alargada de concentrações para cada um dos OEs a testar de forma a avaliar a toxicidade destes num período de 24 a 48 horas. Deste modo, poder-se-ia definir a ordem de grandeza para a qual se verifica uma actividade letal que abranja valores de mortalidade inferiores a 50% e até 100%. Posteriormente, para um leque reduzido de concentrações mais apropriadas, seria possível determinar os parâmetros de letalidade (CL50 e CL90).

Porém, antes mesmo da realização do ensaio preliminar surgiram algumas dúvidas de natureza técnico-científica que levaram à necessidade de comparar os critérios adoptados pelos diversos investigadores da área quanto à definição de terminologias, passos experimentais, aquisição de dados e seu tratamento, etc. Este estudo bibliográfico também permitiu tomar conhecimento da existência de normas experimentais definidas pela OMS para a standardização dos ensaios de insecticidas (World Health Organization, 2005). Assim, foi adoptada uma metodologia de testes standardizada para este tipo de avaliação biológica seguindo as recomendações do *Expert Committee on Insecticides* da Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, 1968; World Health Organization, 1996).

A seguir estão apresentadas as principais questões que foram ponderadas e estiveram na origem da realização de alguns ensaios simples no sentido de definir e otimizar a metodologia e as condições para os ensaios subsequentes:

Como se poderia proporcionar uma mistura, a mais homogênea possível entre os dois componentes imiscíveis de naturezas distintas e ultrapassar assim a limitação associada ao facto de aplicar OEs em fase aquosa, constituinte principal do meio de manutenção das larvas?

Qual seria a gama alargada de concentrações a testar já que esta depende muito do potencial bio-activo de cada extracto? Qual a terminologia e unidades de concentração a usar para os OEs?

No caso dos óleos essenciais, teria alguma vantagem a preparação de uma ou mais soluções stocks?

Sabendo o quanto estas questões estariam estritamente relacionadas nenhuma opção de natureza experimental foi tomada sem consulta exaustiva de estudos do género, aconselhamento por partes dos investigadores com experiência nos testes de sensibilidade larvar aos bioprodutos e consideração das restrições resultantes de uma escolha ou estratégia particular. Surgiu então a necessidade de avaliar o problema de solubilidade dos OEs em água e escolher um agente emulsionante, cuja toxicidade nas larvas fosse minimizada, definir uma gama adequada de concentrações a testar e otimizar os procedimentos para reduzir a variabilidade entre ensaios.

2.3.2.2.1. Escolha do agente emulsionante, avaliação da capacidade emulsionante e toxicidade nas larvas

A aplicação de EOs em ensaios de sensibilidade em larvas de mosquito encontra como grande limitação a imiscibilidade do OE com a água. A dispersão natural do OE (menos denso) sob forma de filme ou película fina à superfície da água constituiria um problema na medida em que as larvas necessitam de se colocar em contacto com a superfície, na interface água/ar, para realizar a sua função respiratória quer através dos espiráculos (Culicídeos) quer pelo sifão respiratórios no caso dos Culicíneos. Por esse motivo, a necessidade de “solubilizar” e dispersar o OE o mais homogeneamente possível por todo o meio constituiu um dos desafios do trabalho. Em ensaios deste tipo é comum recorrer a solventes compatíveis, emulsionantes, surfactantes ou ambos. Existe uma grande variedade de compostos ou combinações destes com propriedades emulsionante. No caso específico das emulsões de OEs em água, criadas para avaliar o efeito larvívoro verifica-se na literatura que a

utilização do dimetilsulfóxido (DMSO), dos polisorbatos (*Tween*® 20 ou *Tween*® 80) e/ou do etanol é mais frequente. No entanto, devido à sua toxicidade elevada, o DMSO não nos pareceu ser a opção mais adequada no contexto de uma possível aplicação à larga escala inserida numa estratégia de combate aos mosquitos vectores de doenças. O *Tween*® 20 é um derivado de polioxietileno (20 unidades) com monolaureato e sorbitol ($C_{58}H_{114}O_{26}$) e pertence à família dos polisorbatos. Este composto é estável, de toxicidade relativamente baixa e muito usado no dia-a-dia numa variedade de aplicações (laboratoriais, farmacológicas e domésticas) como detergente não iónico e emulsionante. Assim, a nossa escolha foi direccionada para o etanol ou o *Tween*® 20.

De modo a avaliar a solubilidade do OE em etanol e *Tween*® 20, recorreu-se a um volume constante de OE de Alfazema efectuando várias misturas em aliquotas com volumes distintos de etanol puro (99%) ou *Tween*® 20 nas razões de 1:2, 1:4 e 1:8 (Volume óleo: volume excipiente). Após agitação vigorosa no vórtex, encheram-se os aliquotas com água desionizada. Observou-se a qualidade da emulsão e efectuou-se a diluição em água desionizada para um volume maior de 15 ml ficando as soluções com 0,33%, 0,67% e 1,33% (v/v) em etanol ou *Tween*® 20. Agitaram-se vigorosamente os balões e deixaram-se em repouso algumas horas. Os resultados foram registados pela observação à vista desarmada e à lupa de forma a comparar o aspecto das soluções (grau de turbidez), dispersão do OE (grau de homogeneização) e presença ou não de gotículas de OE antes e depois das diluições em água (capacidade emulsionante do solvente).

Por outro lado pretendia-se avaliar a toxicidade dos dois excipientes e prever o seu efeito na mortalidade das larvas antes dos ensaios finais. Para tal, realizou-se um pequeno teste à escala reduzida para despistar de forma muito simples a toxicidade destes. Colocaram-se em três tinas, contendo 100 ml das respectivas soluções: 1% (v/v) de etanol, 0,3% (v/v) *Tween*® 20 e água desionizada simples, conjunto de dez larvas no final do 3º estágio. Os recipientes foram deixados numa sala a 24 ± 2 ° C com uma humidade relativa de 47 ± 3 % durante 48 horas. No final desse período de teste registou-se o número de larvas mortas em cada ensaio.

Sabendo porém que a escolha do agente emulsionante não estava somente condicionada pela sua toxicidade a baixas concentrações mas igualmente pela sua capacidade em manter os óleos em emulsão considerou-se a realização de mais dois pequenos ensaios. Assim, de modo a decidir mais conscientemente qual o agente emulsionante, propusemos testar ainda duas concentrações de *Tween*® 20 muito inferiores à usada anteriormente (0,01 e 0,005% v/v). Repetiu-se então o ensaio de

toxicidade em larvas por 24 horas desta vez num volume final de meio de 250 ml com vinte e cinco larvas por cada tina (recomendado pela OMS). Inclui-se ainda um controlo e um ensaio contendo Tween® 20 na menor concentração de 0,005% (0,5 µl/100 ml água) com OE de alfazema a 200 ppm (0,02% v/v) para nos certificar do seu poder surfactante mesmo numa concentração muito inferior relativamente ao volume de OE (1:4) e da água (1:20000). Após 24 horas em contacto com as emulsões registou-se o número de larvas mortas para cada caso.

2.3.2.2.2. Ensaio prévio e definição das concentrações a testar

De modo a solucionar algumas das limitações anteriormente apresentadas e otimizar o método de trabalho considerou-se que a realização de um ensaio prévio de 48h seria imprescindível. Deste modo pretendia-se uma familiarização com a metodologia (preparação das soluções, escolha e captura das larvas, distribuição dos recipientes no espaço, monitorização das condições de temperatura e humidade) e definição de um intervalo de quatro concentrações que permitissem um efeito letal inferior e superior a 50% de morte até perto dos 100%.

Assim, optou-se por utilizar somente três dos OEs disponíveis correspondentes aos dois OEs de funcho e um de alfazema numa gama de concentrações iguais às referidas na tabela 8, à excepção da concentração mais elevada de modo a evitar eventuais desperdícios de OE. Este ensaio preliminar tinha como principal objectivo obter uma indicação do efeito larvicida num intervalo de concentração mais amplo e proceder posteriormente ao ajustamento para concentrações eficazes num intervalo de concentrações mais preciso. Em razão da sua escassez, os OEs de Salsa foram reservados para se proceder directamente aos ensaios sem prévias optimizações.

Para a aplicação dos EOs nas diferentes concentrações realizaram-se misturas em aliquotas individuais dos volumes de OEs referidos na tabela 2 com 10 µl de Tween® 20 moderadamente aquecido para reduzir a sua viscosidade e facilitar a medição com micropipeta. Após uma agitação no vortex acrescentou-se cerca de 1 ml de água destilada voltando a agitar vigorosamente e demoradamente para criar emulsões homogéneas. O ensaio controlo consistiu na mistura do mesmo volume de Tween® 20 em água. Posteriormente, o conteúdo de cada aliquota foi diluído em água destilada de modo a perfazer 225 ml, lentamente agitado para não originar espuma e vertido para as tinas de ensaios. De seguida, adicionou-se para cada tina de ensaio um conjunto de vinte e cinco larvas

de aspecto normal previamente alimentadas e mantidas temporariamente em caixas de *petri* contendo 25 ml de água destilada. Entre o momento da recolha das larvas até à colocação nas tinas decorriam sempre pelo menos 30 min. permitindo que estas se ambientassem e que se pudesse observar a reacção destas à captura. A distribuição das tinas na sala de ensaio foi efectuada de modo que cada tipo de OE estivesse consideravelmente afastado dos outros para evitar ou atenuar os efeitos cruzados dos voláteis presentes no ar. As condições de temperatura e humidade relativa (UR) na sala de ensaios foram monitorizadas diariamente, tendo variado entre 22 a 25 °C e 45 a 50 %, respectivamente. A observação e registo do número de indivíduos mortos por tina foram realizados após decorridas 1, 18, 24 e 48 h de exposição.

2.3.2.3. Determinação do efeito larvicida dos OEs no mosquito *An. atroparvus*

Com base nos resultados dos ensaios preliminares foi possível escolher um conjunto de quatro concentrações efectivas para as emulsões dos EOs de funcho e alfavema a aplicar nos ensaios larvicidas. Relativamente ao OE de frutos de salsa não foi possível realizar ensaios prévios em consequência do reduzido volume de OE disponível. Devido à falta de indicações na literatura para concentração com efeito letal dos OEs desta espécie, optou-se por seguir o exemplo dos OEs de funcho e aplicar nos bio-ensaios as concentrações que foram definidas para estes. Para testar o efeito larvicida dos OEs de frutos e folhas/ramificações de funcho e de frutos de salsa aplicou-se exactamente a mesma gama de concentrações (tabela 9). No caso do OE de alfavema as diluições efectuadas abrangeram concentrações um pouco mais elevadas (tabela 9). Para cada tipo de OE, efectuaram-se triplicados de cada diluição assim como do controlo, o que fez um total de quinze tinas por ensaio. As tinas devidamente identificadas foram dispostas em conjuntos de três moderadamente afastadas umas das outras (entre 30 a 50 cm) sendo que cada conjunto correspondia a uma diluição ou ao controlo. As emulsões foram preparadas como referido na secção anterior, à temperatura ambiente, misturando directamente os respectivos volumes de OE puro (tabela 9) com 10 µl de Tween® 20 em aliquotas individuais para cada réplica e para os controlos. A correcta homogeneização dos OEs com o agente surfactante foi proporcionada por agitação prolongada em vórtex. As emulsões foram inicialmente conseguidas por diluição, ainda em aliquotas, num pequeno volume de água e novamente agitadas vigorosamente no vórtex. Posteriormente efectuou-se uma adição gradual de água

desionizada, com leve agitação até perfazer 225 ml, e as emulsões foram distribuídas nas respectivas tinas de ensaios. As larvas que anteriormente tinham sido separadas, contadas e distribuídas para caixas de *petri* de vidro com 25 ml de água desionizada, foram repartidas pelas tinas em conjuntos de vinte e cinco larvas.

Tabela 9. Amostras dos óleos essenciais (OEs) utilizadas nos bio-ensaios, volumes de OEs e conjuntos de concentrações finais aplicadas nas emulsões.

Amostras EO	Volumes de OE/ 250 ml água (µl)	Concentração final (ppm ou µl/l)	Nº de ensaios
Funcho - Frutos	12,5	50	2
Funcho - Frutos	18,8	75	2
Funcho - Frutos	25,0	100	2
Funcho - Frutos	37,5	150	2
Funcho - Folhas	12,5	50	2
Funcho - Folhas	18,8	75	2
Funcho - Folhas	25,0	100	2
Funcho - Folhas	37,5	150	2
Salsa - Frutos	12,5	50	1
Salsa - Frutos	18,8	75	1
Salsa - Frutos	25,0	100	1
Salsa - Frutos	37,5	150	1
Alfazema - Flores	62,5	250	1
Alfazema - Flores	75,0	300	1
Alfazema - Flores	87,5	350	1
Alfazema - Flores	100	400	1

A distinção entre as larvas mortas/moribundas e as vivas foi efectuada como referido anteriormente e a mortalidade das larvas em cada tina foi monitorizada às 3, 18, 24 e 48 horas de exposição. Os valores médios de mortalidade para cada tratamento foram calculados e corrigidos relativamente ao valor médio registado no controlo negativo (solução de Tween® 20 a 0,004%) aplicando para o efeito a fórmula de Abbot (World Health Organization, 1968):

$$\text{Mortalidade corrigida} = \frac{\text{Mortalidade bruta(\%)} - \text{Mortalidade controlo(\%)}}{100 - \text{Mortalidade controlo(\%)}}$$

Por outro lado, foi efectuado um tratamento dos dados de modo a estabelecer uma relação linearizada das respostas biológicas em função do estímulo. A relação dose efeito em termos gráficos será um indicador de susceptibilidade ou resistência da nossa população, conforme a recta é linear ou não. A transformação dos resultados, que se apresentavam inicialmente com uma relação dose-efeito do tipo sigmóide, foi levada a cabo submetendo os dados a análise Probit no software SPSS (SPSS 16.0 for Windows, SPSS Inc.). Os valores de Probit foram calculados com base no número de sujeitos que responderam relativamente a um total de indivíduos testados considerando igualmente a reposta obtida nos ensaios controlo (ausência de estímulo) para uma melhor correcção e ajuste às situações de morte resultante de outros factores (efeito do agente emulsionante, competição, morte natural, etc.). Obtiveram-se assim, regressões lineares do tipo Log-Probit em que a mortalidade (escala probit) é expressa em função do logaritmo na base de 10 das doses/concentrações usadas em cada ensaio. O ajustamento das regressões aos valores obtidos foi avaliado por aplicação de tratamento estatístico como o teste de Pearson e determinação dos valores de Qui-quadrado. A partir das rectas de regressão efectuou-se a determinação das doses efectivas/letais CL50 e CL90 correspondentes a uma mortalidade de 50% e 90% das larvas respectivamente e com intervalos de confiança a 95%, para cada tipo de OE e após 24 e 48 h.

3. Resultados e Discussão

3.1. Culturas *in vitro*

Como foi já abordado em 2.1., uma grande componente do trabalho desenvolvido para esta dissertação de mestrado consistiu no desenvolvimento de culturas *in vitro* de alfazema, funcho, aneto e salsa. Embora a maioria das experiências realizadas fossem, na generalidade, tentativas sucessivas de estabelecimento das cultura em condições de assepsia, especialmente para as espécies de Apiaceae, no caso particular da *Lavandula angustifolia* procurou-se desenvolver outro tipo de cultura, nomeadamente culturas de tecidos indiferenciados. Desde a fase inicial dos trabalhos tomou-se consciência de que a iniciação de culturas *in vitro* constitui uma tarefa de duração deveras variável. No caso de protocolos otimizados e espécies fáceis de propagar, podem ser suficientes poucas semanas para a obtenção de material vegetal adequado para avançar com outro tipo de experiência baseada em culturas *in vitro*. Porém, as espécies obtidas a partir de sementes de germinação lenta ou difícil, e/ou portadoras de vírus/microrganismos intrínsecos, como é o caso de algumas espécies de Apiaceae, necessitam de várias tentativas, paciência e longos períodos de tempo até se definir uma metodologia adequada para a obtenção de culturas assépticas. Para algumas das espécies estudadas, o estabelecimento das culturas requereu de facto grande parte do tempo dedicado a estes trabalhos *in vitro*, o que limitou forçosamente o andamento dos trabalhos. Por acréscimo não poderia deixar de referir que o desenvolvimento dos trabalhos foi severamente afectado pelo incêndio sucedido na sala de culturas *in vitro*, no início deste ano, incêndio este que levou à perda de algumas culturas e que impediu a ocupação da sala durante mais de quatro meses.

3.1.1. Culturas *in vitro* de *L. angustifolia*: Micropropagação e Callogénese

Como referido anteriormente, *L. angustifolia* foi a única das espécies incluídas no estudo que não exigiu a iniciação das culturas *in vitro* por se encontrar pré-estabelecida e em manutenção há já alguns anos. As culturas de rebentos caulinares encontravam-se em subcultura em meio MS com uma pequena suplementação de citocinina (BA a 0,25 mg/l) e sob intensidades luminosas variáveis há mais de três anos. Todavia, perante a constatação de que a resposta dos explantes ao meio fora diminuindo ao longo do tempo, optou-se por incluir neste trabalho algumas tentativas de melhoramento do crescimento das culturas (Figura 20).

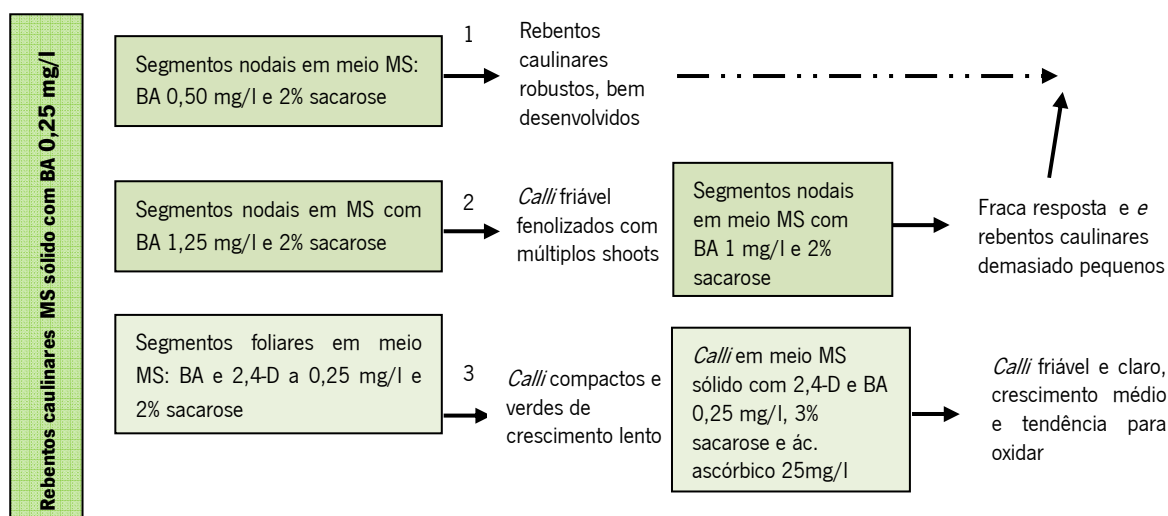


Figura 20. Resumo esquematizado do procedimento experimental e resultados obtidos com culturas *in vitro* de *Lavandula angustifolia*.

Nos estudos de micropropagação uma parte dos explantes nodais foram repicados para meio MS suplementado com BA a 0,50 mg/l. Os explantes reagiram bem formando dois rebentos caulinares (um rebento a partir de cada meristema axilar) de tamanho razoável e aspecto forte (figura 21). Os rebentos caulinares permaneceram em cultura até às oito semanas para prolongar o seu crescimento. Porém durante esse período (após seis semanas) ocorreu uma interrupção de luz e alteração da mesma devido à mudança de sala (consequência de um incêndio ocorrido na sala de culturas). Felizmente, as plantas não se ressentiram com a mudança à excepção de um aumento do crescimento linear provavelmente em resposta a uma intensidade luminosa inferior. Devido às alterações das condições de cultura ao longo do período experimental, não foi efectuado o estudo das cinéticas de crescimento. Apesar disso, a suplementação com BA a 0,5 mg/l foi considerada mais eficaz que a anterior pela constatação de um aumento do número de explantes que responderam e pelo maior desenvolvimento foliar. Considerando as melhorias obtidas conclui-se que a manutenção das subculturas seria mais apropriada sob o efeito desta concentração de BA (0,5%) embora com a consciência de que, tal como anteriormente, existia a propabilidade de haver habituação das culturas ao longo do tempo.



Figura 21. Culturas *in vitro* de rebentos caulinares de *Lavandula angustifolia* obtidas por micropropagação de segmentos nodais em meio MS suplementado com BA (0,5 mg/l) após três semanas de cultura.

A subcultura de plântulas mantidas em meio MS com BA a 0,25 mg/l e colocadas em meio de cultura com uma concentração de BA a 1,25 mg/l sob intensidade de 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, resultou na formação de múltiplos e finos rebentos caulinares suportando folhas exageradamente pequenas, morfologicamente distintas das que são habitualmente obtidas nesta espécie. A formação de múltiplos rebentos pouco robustos com folhas diminutas por efeito do aumento da concentração de BA para 1,25 mg/l, conduziu ao abandono desta suplementação hormonal em subculturas subsequentes, tanto mais que num estudo realizado previamente com estas culturas se tinha verificado que concentração crescente de BA a 0,25, 0,50 e 1,0 mg/l (a PAR constante) poderiam conduzir a uma aparente redução do teor em OE (Sousa, 2006). Porém, nesse estudo não se conseguiu relacionar essa tendência com o número de glândulas secretoras por área de folha ou estado de maturação dos próprios tricomas secretores para justificar os resultados. Sabe-se porém, com base nalguns trabalhos realizados com culturas *in vitro* de *Lavandula dentata*, que a aplicação de concentrações reduzidas de BA (0,1mg/l) apresenta um efeito positivo evidente na acumulação de OE nos tricomas secretores (mais 150% do rendimento em OE) resultante do aumento do número de tricomas glandulares em fase secretora (Sudriá *et al.*, 1999; Sudriá *et al.*, 2001). Acreditamos que esta citocianina poderá ter um contributo muito positivo na produção/acumulação de OE ao nível da formação dos tricomas somente para concentrações muito reduzidas, tal como havia sido constatado anteriormente (Sousa, 2006). Para se atingir um rendimento considerável nestas culturas devem-se considerar os vários aspectos envolvidos na acumulação de OE. Assim, procurou-se estabelecer um compromisso em que se pudesse beneficiar dos possíveis efeitos positivos da citocianina relativamente à acumulação de OE minimizando os seus efeitos menos favoráveis (ausência de resposta dos explantes, hiperhidricidade, desenvolvimento de rebentos caulinares pouco robustos e folhas pouco desenvolvidas). De facto,

quando se pensa em termos de biomassa global produzida *in vitro*, o recurso a concentrações elevadas de BA, com a finalidade de induzir a acumulação e maturação das glândulas secretoras, não irá surtir grande efeito se em contrapartida o crescimento dos rebentos caulinares, especialmente da área das folhas, não for suficiente para permitir o desenvolvimento de uma densidade considerável de glândulas secretoras.

Assim, no intuito de obter uma resposta intermédia equilibrada, optou-se por colocar alguns destes segmentos nodais em meio MS numa concentração de BA um pouco inferior (1mg/l). Porém, Muitos segmentos não reagiram ou desenvolveram muito pouco atingindo um a dois nós de altura. Do mesmo modo que a anterior (1,25 mg/l de BA), esta suplementação foi considerada pouco adequada pois, para além do seu raquitismo, alguns rebentos caulinares apresentavam uma acumulação excessiva de água nos tecidos (hiperhidricidade). No conjunto dos resultados obtidos, constatou-se que a concentração de 0,50 mg/l de BA constituía uma suplementação adequada ao crescimento dos rebentos caulinares robustos e de folhas largas, admitindo-se um provável efeito positivo na produção e acumulação de OE. Não se considerou pertinente modificar o tipo de citocianina uma vez que tem sido constatado que esta citocianina tem um efeito positivo no aumento da actividade enzimática específica da HMG-CoA redutase (cerca do dobro) quando aplicada a culturas de rebentos caulinares (Sudriá *et al.*, 1999; Sudriá *et al.*, 2001).

A subcultura de segmentos de folhas, isolados de plântulas crescidas em meio MS com BA a 0,25 mg/l, colocada em meio MS com uma suplementação hormonal de 2,4-D e BA, ambos à concentração de 0,25 mg/l, e sob luz PAR de 15 a 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, resultou em *calli* extremamente desenvolvidos bilateralmente aos explantes foliares, acabando por envolver os explantes iniciais após um período de cultura de oito semanas. O desenvolvimento dos *calli* compactos e de coloração verde foi-se prolongado até estes atingirem um tamanho considerável. Observou-se porém que a base destes, mergulhada no meio, apresentava uma coloração negra. De modo a prevenir o despoletar do processo de oxidação e a escassez de nutrientes, optou-se por realizar a primeira subcultura providenciando a incorporação de ácido ascórbico ao meio de cultura (25 mg/ml) e ao aumento da concentração de sacarose de 2 para 3%. À medida que os *calli* da subcultura se desenvolviam observou-se uma alteração no aspecto e coloração em redor dos *calli*. Essa alteração foi se generalizando na segunda subcultura levando à formação de massas mais friáveis e heterogêneas com diminuição da coloração verde. Por outro lado, o crescimento celular da segunda subcultura intensificou-se e os *calli* expandiram-se rapidamente sobre a superfície do meio após três semanas de cultura (figura 22, a e b).

A segunda geração de *calli* foi considerada visivelmente distinta dos *calli* obtidos primariamente. O intenso crescimento das biomassas levou a uma antecipação da terceira subcultura, no decorrer da quarta semana. Porém, após cerca de duas semanas sob intensidade luminosa PAR de 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e temperatura acima dos 24 °C, registou-se uma mudança evidente nas culturas de *calli* que começaram a oxidar muito rapidamente do exterior para o interior (Figura 22, c e d).

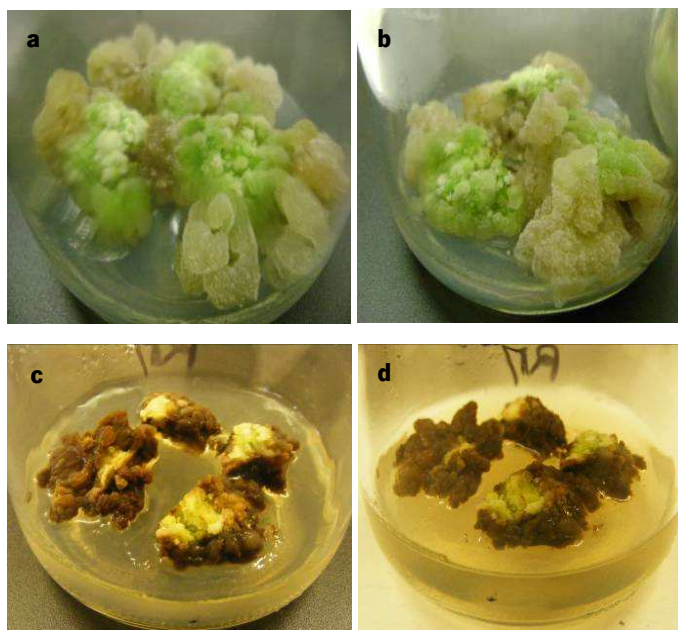


Figura 22. Fotografias de culturas *in vitro* de *calli* de *L. angustifolia* em meio sólido. a), b) Segunda subcultura obtida a partir de explantes foliares crescidos em meio MS com 2,4-D e BA a 0,25 mg/l, ácido ascórbico a 25 mg/l e sacarose a 3%. c), d) Quarta subcultura de *calli* com agravamento dos sinais de fenolização a partir da terceira subcultura.

3.1.2. Estabelecimento e desenvolvimento das culturas *in vitro* de Apiaceae

3.1.2.1. Culturas *in vitro* de *F. vulgare* var. *vulgare*

Nos seis dias que seguiram a data de inoculação das sementes de *Foeniculum vulgare*, cerca de metade dos tubos de cultura tinham desenvolvido contaminações fúngicas. Nos restantes tubos, os primeiros casos de germinação foram registados pouco antes da quarta semana. As sementes foram germinando de forma muito assíncrona ao longo do tempo sendo que uma grande parte delas ainda

não tinha germinado ao aproximar da oitava semana. Por esse motivo e pela reduzida quantidade de réplicas optou-se por não determinar a percentagem de germinação para este ensaio.

O aumento do tempo de hidratação a que as sementes foram sujeitas (de poucas horas a 24h), a extensão do período de desinfecção e a inoculação das sementes em meio MS com metade dos nutrientes, permitiu reduzir o número de contaminações e acelerar a germinação das sementes. Assim, para grande parte das sementes, a germinação foi notoriamente mais rápida (duas a três semanas). Porém, a fase da germinação não foi coincidente para todas as sementes e acabou por se estender para além das cinco semanas. Neste ensaio, levado a cabo com uma totalidade de 573 sementes, determinou-se que $50 (\pm 7,55)$ em 100 sementes já tinham germinado sete semanas após a inoculação.

Este resultado, embora obtido em laboratório, corrobora os dados obtidos por Barbosa e colaboradores (2007) que, no decorrer de um estudo de caracterização da biodiversidade nas populações silvestres de funcho, registaram uma grande heterogeneidade no tamanho das sementes assim como nas percentagens de germinação para sementes provenientes de espécimes colhidos em acessos localizados na região Norte de Portugal ($46 \pm 17,6 \%$). Estes autores confirmaram que as sementes de variedades comerciais doce e silvestre são, no geral, de maiores dimensões apresentando maior capacidade germinativa relativamente as populações naturais (90 a 95% de germinação para as variedade comerciais adquiridas). Contudo, o processo de germinação foi consideravelmente mais rápido do que no estudo aqui desenvolvido, pois as sementes das diferentes populações manifestaram sinais de germinação oito a doze dias após a sementeira (Barbosa *et al.*, 2007). Todavia, supõe-se que na realidade o índice de germinação relativo às sementes viáveis pudesse ter sido superior em ambos os casos se fosse possível descartar as sementes inviáveis durante a inoculação. Porém, segundo Robinson (1954), a diferenciação de sementes viáveis das que não contêm embriões não pode ser realizada mecanicamente com base no peso ou aspecto das sementes pois o embrião constitui uma parte muito reduzida do peso total do fruto (Robinson, 1954). Segundo este autor, cerca de 34% de sementes comerciais de funcho de Florença poderão ser desprovidos de embrião.

No período a seguir à germinação, surgiu a necessidade de endireitar grande parte das plantinhas que desde então tinham adquirido orientações anormais como raízes fora do meio de cultura ou crescendo em sentido anti-geotrópico. Por esse motivo foram retiradas e colocadas correctamente no meio para facilitar o seu enraizamento e crescimento. Este comportamento não se deveu ao fototropismo pois não existia fonte de luz em níveis inferiores. Poderá ter resultado do peso



Figura 23. Plantas de *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* germinadas e crescidas *in vitro* em meio MS a partir de sementes colhidas em espécie silvestres. Da esquerda para a direita: Fase inicial das culturas em meio $\frac{1}{2}$ MS, oito semanas após a inoculação; Plantas inteiras em meio MS catorze semanas após inoculação; Estado de plantas inteiras à 20ª semana após a inoculação das sementes. Plantas obtidas após trinta semanas de desenvolvimento.

do tegumento da semente que se encontrava ainda a envolver as duas primeiras folhas (cotilédones) causando inevitavelmente um maior peso na parte aérea da planta relativamente à radícula ainda em desenvolvimento. Por outro lado, é provável que, devido ao maior diâmetro interior dos frascos relativamente aos tubos, as plântulas encontrassem mais espaço à sua disposição possibilitando outro tipo de posição menos esperada. As jovens plantas de funcho foram-se desenvolvendo no meio de germinação até se constatar que já estariam a necessitar de mais espaço e naturalmente de maior disponibilidade de nutrientes. Assim, optou-se por transferir as plantulas para meio MS completo de forma a continuar o desenvolvimento destas sem recorrer a técnicas mais morosas que dependem de fitoregulação e optimização desta (micropropagação de meristemas axilares, organogénese ou embriogénese somática). Este tipo de trabalhos com culturas *in vitro* desta espécie encontram-se já descritas (Hulnaut e Du Manoir, 1992). As plantas foram crescendo de modo relativamente homogêneo (figura 23). Desde então as culturas têm sido mantidas com sucesso em meio MS sem fitoreguladores sob intensidade luminosa entre 60 e 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Embora as partes aéreas (folhas) já não sejam tão fartas, as raízes por seu lado adquiriram um diâmetro e comprimento considerável de tal modo que se teve de proceder a cortes ocasionais durante as manipulações. Apesar disto, a operação não pareceu acarretar consequências negativas nas plantas até porque as raízes adventícias apresentaram uma grande capacidade regenerativa ao longo das repicagens.

3.1.2.2. Culturas *in vitro* de *A. graveolens*

A incubação de sementes de *Anethum graveolens* em meio ½ MS sólido a uma temperatura elevada de 24-25° C e com intensidade luminosa de 70 e 90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ permitiu que, após somente quatro dias, os primeiros sinais de germinação surgissem. Decorridas umas semanas não se registou qualquer sinal de contaminação e a grande maioria das sementes já deixavam avistar a radícula mergulhada no meio e os dois cotilédones clorofilinos. A germinação foi considerada excepcional pelo reduzido tempo decorrido e pela sincronia da resposta germinativa. Assim a percentagem de germinação pôde ser avaliada por volta das quatro semanas. Num total de 327 sementes, distribuídas por trinta e dois tubos de cultura, em média 89 ($\pm 10,1$) sementes em 100 tinham germinado. Este óptimo resultado em nada se compara ao registado para o ensaio de germinação *in vitro* de funcho silvestre.

Desde a primeira subcultura verificou-se uma multiplicação evidente do número de rebentos secundários em cada planta de tal modo que se tornou impraticável uma contagem destes (figura 24). Adicionalmente, algumas plantas desenvolveram também um rebento caulinar muito alongado e robusto de maior diâmetro. Esta estrutura vegetativa diferia bastante dos múltiplos rebentos secundários devido à existência de nós e entre-nós alongados. Porém o surgimento desta tipologia de estrutura vegetativa, análoga ao caule principal que suporta as estruturas reprodutivas na planta *in vivo*, resultou num problema evidente de espaço no interior dos frascos. Para as plantas afectadas por essa resposta (cerca de quarenta) não foi possível manter a sua integridade por mais tempo o que levou à necessidade de proceder ao isolamento de explantes nodais, a partir desse caule principal, e à separação de um “explante basal” constituído pelas múltiplas folhas e raízes. A grande maioria dos explantes nodais deram origem a um rebento caulinar relativamente fino devido ao facto de cada nó suportar somente um meristema axilar com disposição alternada (e não oposta) ao longo do caule.

O surgimento destes caules alongados foi considerada uma óptima oportunidade para se isolar segmentos robustos de entre-nós muito mais adequados à aplicação de protocolos de infecção com *Agrobacterium rhizogenes* do que os caules foliares (peciolos) que são demasiado finos, ocos e difíceis de manipular. Porém, a escolha destes segmentos nodais como explantes com potencial para dar continuidade às culturas é bastante incerto e discutível visto que no ciclo desta planta o caule principal, geralmente com poucas folhas, surge numa fase avançada do desenvolvimento e está normalmente associado à formação das umbelas que suportam as flores e mais tarde os frutos. Assim conclui-se

que o recurso a este único explante como modo de conservação das culturas poderia não ser uma opção segura de micropropagar tecidos diferenciados para esta planta. Pelo contrário, a constatação do grande potencial regenerativo nos explantes designados de “basais”, que incluíam múltiplas folhas emergentes de uma base comum ligada à parte radicular, leva-nos a considerar este explante como o mais versátil e estável para dar continuidade aos estudos *in vitro*, nomeadamente para testar o efeito de variações das suplementações hormonais na embriogénese. Actualmente, as culturas continuam em desenvolvimento nas mesmas condições de luz entre 60 a 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ sendo as alterações morfológicas registadas ao longo do tempo.



Figura 24. Plantas *in vitro* de *Anethum graveolens* obtidas por germinação de sementes comerciais em ½ meio MS e desenvolvidas em meio MS completo. Da esquerda para a direita: Plântulas resultantes da germinação das sementes duas semanas após a inoculação; Desenvolvimento das plantas jovens colocadas em meio MS, decorridas sete semanas desde a inoculação; Aspecto das plantas crescidas em meio MS catorze semanas após a inoculação das sementes; Aspectos das plantas com múltiplas folhas após vinte semanas de culturas em meio MS.

3.1.2.2. Culturas *in vitro* de *P. crispum* spp. *neapolitanum*

A grande maioria dos frascos onde foram inoculadas as sementes resultantes da primeira tentativa de estabelecimento de culturas de salsa desenvolveram contaminações fúngicas enquanto que nos restantes frascos que ficaram não se registou germinação. Pelo contrário, no vaso com terra onde foram inoculadas as sementes igualmente desinfetadas foram surgindo as primeiras plantinhas à terceira semana. Porém, após algum tempo de desenvolvimento, as plantas obtidas em vaso surgiram contaminadas por fungos levando ao seu enfraquecimento e morte.

A segunda tentativa, com sementes comerciais submetidas a um tempo de hidratação prévio de 24 h, lavagens rigorosas e desinfecção com 4% de hipoclorito activo por quinze minutos foi igualmente infrutífera, dado que, novamente não se verificou nenhum caso de germinação, mesmo após dois meses de incubação sob baixa intensidade de luz e temperatura adequada (25° C), embora, desta vez, não tenham surgido qualquer contaminação. A lentidão e dificuldade no processo de germinação das sementes desta e outras espécies da mesma família é do conhecimento de qualquer horticultor, tendo esta problemática sido discutida a cerca de cinco décadas atrás por Robinson (1954). A consulta simultânea de estudos que incidem sobre a germinação desta e de outras espécies permitiu compreender o papel da pré-embebição, temperatura, uso de agentes osmóticos e fitohormonas na germinação de sementes de salsa lisa (Rodrigues *et al.*, 2008; Thomas, 1996). Tendo em conta o papel crucial de um nível adequado de hidratação, que permita a quebra da latência e reactivação do metabolismo, introduziram-se então mais algumas modificações na metodologia. Assim, nesta terceira tentativa apostou-se num período de embebição das sementes 48h antes da sua desinfecção, no recurso a um agente osmótico (NaNO_3) e na remoção completa dos nutrientes no meio de germinação (apenas meio agarizado como suporte). Deste modo, conseguiu-se que as sementes, colocadas sobre papel de filtro embebido em NaNO_3 em placas com agar, fossem germinando, ainda que, de um modo muito irregular (figura 25). No final da segunda semana, 19 ($\pm 7,4$) % de um total de 743 sementes já tinham germinado e ao fim de cinco semanas registou-se uma percentagem de 51 ($\pm 10,8$) % de germinação. Apesar de se terem obtido cerca de 376 plântulas prontas para serem transferidas para meio de cultura, somente 156 jovens plantas foram seleccionadas descartando os exemplares com morfologias anormais ou os que se encontravam em placas atingidas por contaminações fúngicas. Desde então as plantas têm sido cultivadas em meio MS sob intensidade luminosa entre 60 e 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e apresentam um desenvolvimento óptimo (figura 25). É de realçar, que no final de quatro meses de cultura, a parte radicular atingiu um nível de desenvolvimento surpreendente sendo a proliferação das raízes de tal modo acentuada e compacta que impediu por completo a conservação da sua integridade durante o processo de transferência de meio (figura 25). A manutenção deste tipo de tecido diferenciado, embora separado da planta, foi considerada uma óptima oportunidade de iniciação de culturas de raízes para posteriores estudos fitoquímicos, não somente pelo facto destas serem abundantes e serem acumuladoras de compostos voláteis de interesse como o dillapiol, apiole e/ou a miristicina (Hulnaut e Du Manoir, 1992; Lamarti *et al.*, 1993) mas também pela constatação de que, nalguns casos, ocorria a produção de pigmentos de coloração arroxeada (figura 26).



Figura 25. Germinação *in vitro* de semente comerciais de *Petroselinum crispum* var. *neapolitanum* em agar e NaNO_3 0,2% e desenvolvimento das plantas em meio MS completo. Da esquerda para a direita: Resultado da germinação das sementes em Placa de petri com meio agarizado e papel de filtro após cinco semanas; Plântulas mantidas em meio MS durante três semanas (cinco semanas desde inoculação); Plantas desenvolvidas em meio MS com doze semanas (após inoculação); Plantas com quatro meses de desenvolvimento.



Figura 26. Registos fotográficos dos sistemas radiculares de plantas de *Petroselinum crispum* evidenciando uma densa proliferação após um cultivo *in vitro* de dezasseis semanas em meio MS. No topo: Fotografias de plantas de salsa que apresentaram acumulação evidente de pigmentos nas raízes e alguns caules; Em baixo: Plantas de salsa com uma dominância de raízes de coloração normal.

Numa análise dos resultados obtidos nesta fase experimental, conclui-se que os obstáculos encontrados para a germinação das sementes, em particular para *Petroselinum crispum*, podem ser ultrapassados desde que seja proporcionado às sementes tempos de pré-hidratação adequados. A água actua como um agente promotor do amolecimento do tegumento, do aumento do volume do embrião e tecidos de reserva e estimulador as actividades metabólicas básicas. Nalguns estudos de embebição em água realizados nomeadamente com a salsa, reuniram-se evidências de que a absorção de água pelas sementes, em condições óptimas de temperatura, não ocorre de forma constante mas sim de acordo com um padrão trifásico (Rodrigues *et al.*, 2008). Numa primeira fase designada fase I ou fase da embebição, a absorção de água é consequência das forças matriciais e decorre até as sementes atingem teores de água entre 30% a 40%. Quando se atinge um balanço entre o potencial osmótico e o potencial de pressão, a absorção de água estabiliza iniciando-se a fase II ou fase estacionária durante a qual ocorre a digestão e o transporte activo das substâncias de reserva. Posteriormente, inicia-se a fase III com a emissão da raiz primária (Rodrigues *et al.*, 2008).

Relativamente às tentativas de desinfecção de material vegetal de salsa adulta desenvolvidas em paralelo, constatou-se que inicialmente os diferentes segmentos reagiam relativamente bem ao processo de desinfecção. No entanto, à medida que o tempo ia passando parte dos explantes incluindo os pecíolos, as folhas e os meristemas perderam a sua coloração verde e acabaram por morrer. Por seu lado, os segmentos de medula de raízes e de caules não sofreramam modificações e não apresentaram qualquer resposta à suplementação hormonal de 2,4-D a 0,25mg/l. Tendo em conta que esta abordagem, repetida duas vezes, não permitiu o estabelecimento de qualquer cultura de tecidos, optou-se por não iniciar as culturas *in vitro* por este método e apostar unicamente no desenvolvimento das plantinhas que entretanto tinham sido obtidas por germinação em placas agarizadas e em condições de assépsia.

3.1.3. Indução de *Hairy roots* por infecção com *Agrobacterium rhizogenes*

As tentativas de transformação genética de *F. vulgare* var *vulgare* e *P. crispum* spp. *Neapolitanum*, mediadas por *Agrobacterium rhizogenes*, foram infrutíferas devido à morte demasiado rápida dos explantes. No caso do funcho somente três dos explantes utilizados (segmentos de pecíolos) num total de cinquenta e cinco (incluindo os ensaios controlo não sujeito a infecção) permaneceram verdes e conseguiram manter-se vivos por mais de seis semanas. Porém, nenhum deles manifestou qualquer tipo de resposta rizogénica. Do mesmo modo, a tentativa de infecção e indução de *hairy roots*, recorrendo a dois tipos de segmentos provenientes de plantas *in vitro* de *P. crispum*, não foi bem sucedida. Apesar de se terem desenvolvido duas tentativas consecutivas esta espécie, envolvendo cerca de cento e cinquenta explantes no total, em nenhum caso se registou a sobrevivência dos segmentos foliares ou peciolares (figura 27). Esta resposta generalizada é de facto intrigante mas consistente com os resultados referidos no final na secção anterior relativamente à morte de todos os tipos de segmentos de salsa, incluindo os mais vigorosos, no seguimento do protocolo de desinfecção (figura 13). Em ambas as situações, os segmentos foliares eram os primeiros a indiciar um amarelecimento dos tecidos, perda das clorofilas e morte rápida da folha (figura 27).

Tanto quanto é do nosso conhecimento, a obtenção de *hairy roots* de *Petroselinum crispum* não foi ainda reportado enquanto a indução de *hairy roots* em *Foeniculum vulgare* e regeneração das respectivas plantas transgénicas foram já alvo de publicações (Sugiura *et al.*, 1998 e 2000). O estudo dos OEs produzidos pelas plantas transgénicas revelou variações de composição designadamente quanto aos teores de *trans*-anetole, α -felandreno e dill apiole permitindo distinguir quatro grupos diferentes de plantas em função dos perfis fitoquímicos (Sugiura *et al.*, 1998).

Uma parte significativa (25-62%) dos segmentos internodais de *Anethum graveolens* que sobreviveram ao processo de transformação genética apresentavam raízes cerca seis semanas após o contacto com *A. rhizogenes* (tabela 10). Embora alguns segmentos peciolares tivessem apresentado também formação de raízes, a eficácia destes segmentos foi substancialmente inferior à dos segmentos nodais (tabela 10). O facto de ter havido formação de raízes a partir de um dos segmentos internodais utilizado como controlo alimenta a dúvida quanto às características transgénicas das raízes obtidas dos explantes tratados com *A. rhizogenes*. Em termos morfológicos, nem todas as raízes formadas apresentaram o mesmo desenvolvimento (figura 28 c e d) sendo que algumas permaneceram relativamente pequenas e pouco ramificada (figura 28, d).

Tabela 10. Resultados da obtenção de raízes em segmentos peciolares e internodais de plantas *in vitro* de *Anethum graveolens* registados cerca de seis semanas após a infecção com *Agrobacterium rhizogenes*.

	Tipo de explante	Nº de explantes	Nº explantes sobreviventes	Nº de explantes com raízes	% Formação de raízes
Controlo	Pecíolo	8	3	0	0,0
Controlo	Entre-nós	7	7	1	14,3
Placa 1	Pecíolos	14	2	2	100*
Placa 2	Pecíolos	13	0	0	0*
Placa 3	Entre-nós	16	16	4	25,0
Placa 4	Entre-nós	17	17	8	47,1
Placa 5	Entre-nós	14	13	8	61,5

* A percentagem de resposta indicada não é representativa devido ao facto de um elevado número de segmentos não terem sobrevivido.

De modo a avaliar a viabilidade e o crescimento das possíveis *hairy root* de aneto, procedeu-se ao isolamento das raízes que se encontravam suficientemente desenvolvidas para iniciar culturas em meio MS sólido, sem fitoreguladores ou antibiótico, em condições de ausência e presença de luz (PAR entre 40 e 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) (figura 29 a e b). As culturas de raízes transformadas crescidas sem luz apresentaram um desenvolvimento mais acentuado relativamente às raízes sujeitas a fotoperíodo. Estas últimas têm vindo a expandir-se no meio de cultura, porém o crescimento é mais lento. Pelo contrário, os exemplares de raízes normais provenientes de plantas *in vitro* não transformadas e colocadas igualmente em cultivo em meio MS base sem suplementação hormonal, permaneceram relativamente pouco desenvolvidas (figura 29).

Tendo em conta os aspectos morfológicos e o facto de estes órgãos terem desenvolvido com sucesso em meio MS sem qualquer suplementação, é espectável que as culturas em crescimento sejam realmente culturas de *hairy roots* de aneto. A confirmação do carácter transgénico dessas raízes pode ser efectuada através de uma análise molecular do respectivo DNA, envolvendo a amplificação (PCR) e detecção dos genes pertencentes ao plasmídeo da estirpe *wild type* de *A. rhizogenes*, o que virá a ser realizado já depois de concluída esta tese. Num futuro próximo, pretende-se elaborar uma análise química dos constituintes voláteis produzidos por ambos os tipos de culturas de raízes.



Figura 27. Registo fotográfico dos resultados obtidos cerca de quatro semanas após a infecção dos segmentos de funcho e salsa com *Agrobacterium rizogenes*. À esquerda: Ensaio com segmentos de peciolo de *F. vulgare var vulgare* cultivado *in vitro*; À direita: Ensaio com diferentes segmentos de *P. crispum* crescido *in vitro*.

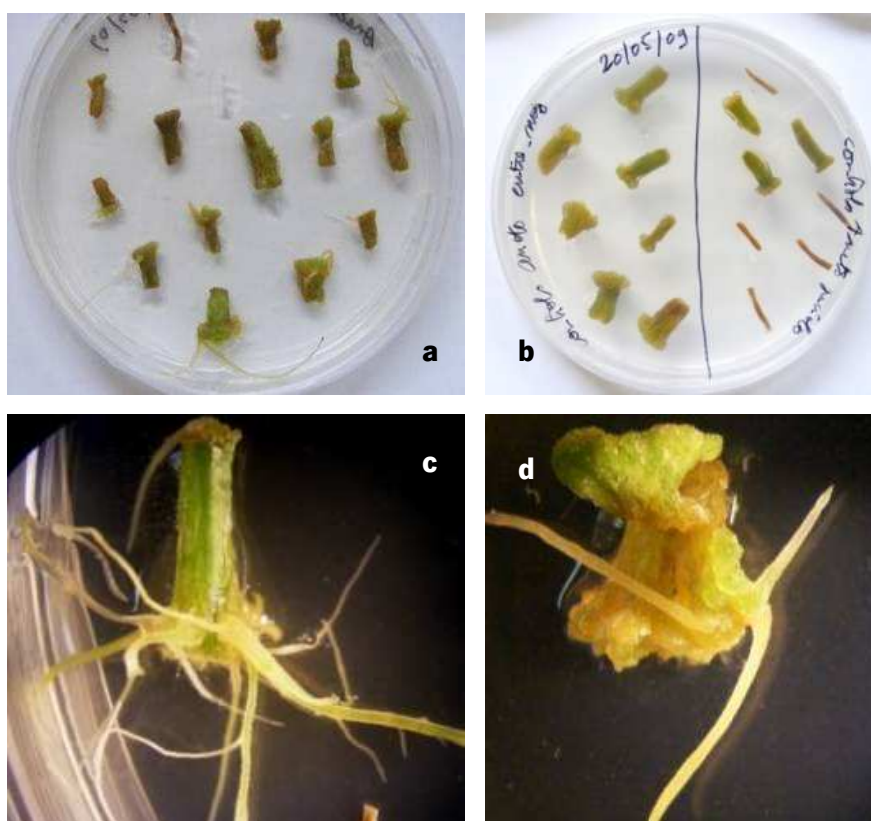


Figura 28. Registos fotográficos dos segmentos de *Anethum graveolens* cerca de quatro semanas após terem sido sujeito a infecção com *Agrobacterium rizogenes*. a) Resultado pormenorizado para uma das placas do ensaio na qual foram utilizados segmentos de entre-nós; b) Resultado pormenorizado para os explantes que constituíram o ensaio controlo; c) e d) Observações à lupa (ampliação 6 vezes) das raízes formadas num segmento peciolar e num segmento internodal, respectivamente.

3. Resultados e Discussão

A obtenção de *hairy roots* de *A. graveolens* e caracterização dos respectivos OEs encontra-se já descrita (Santos *et al.*, 2002). Estes autores procederam à infecção de plântulas de aneto, com três a quatro semanas, obtidas igualmente através de germinação de sementes, sem recorrer, no entanto, à segmentação destas. A infecção directa das plântulas em cortes situados no hipocótilo e nas regiões internodais permitiu assim o desenvolvimento de raízes transformadas. Estas caracterizaram-se por um elevado teor em apiole (40%), falcarinol (21%), dill apiole (14%) e miristicina (8%) (Santos *et al.*, 2002).

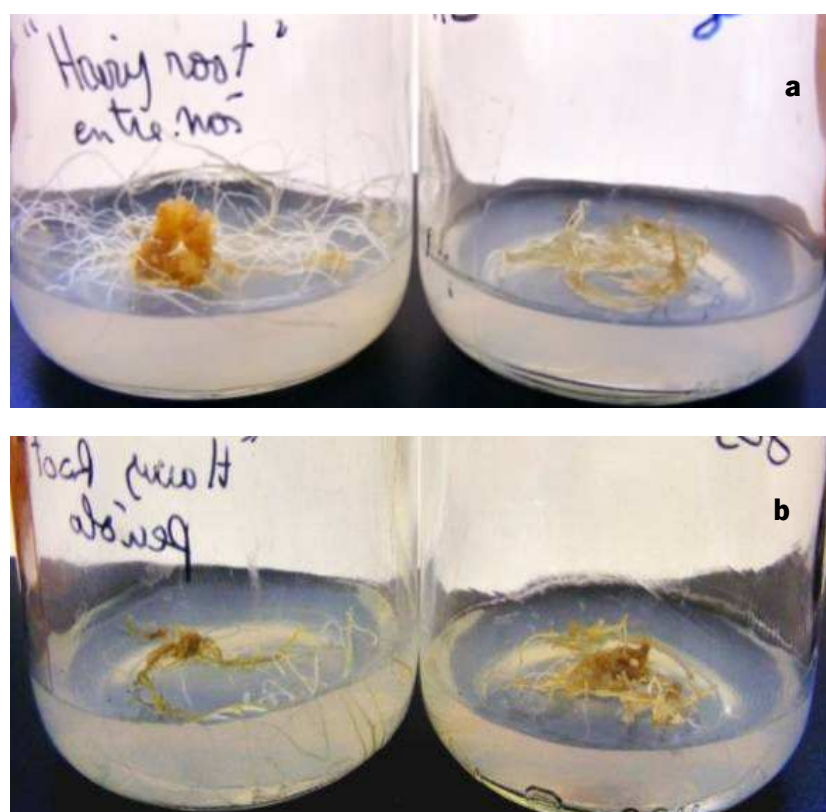


Figura 29. Culturas *in vitro* de *hairy roots* (raízes em cabeleira) e raízes não transformadas de *Anethum graveolens* em meio MS sólido. a) Culturas de *hairy roots* e raízes isoladas de plantas de aneto *in vitro* ambas cultivadas no escuro. b) Culturas de *hairy roots* e raízes separadas de plantas cultivadas sob a intensidade luminosa de 40-60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Nestas últimas, é de nota uma ligeira coloração verde das raízes pelo facto de ambas se encontrarem sujeitas à luz.

3.2. Composição dos Óleos Essenciais

3.2.1. Caracterização dos OEs de *Lavandula angustifolia*

A extracção por hidrodestilação do OE de espigas florais frescas de *L. angustifolia* em plena floração permitiu uma determinação de rendimentos muito elevados, próximo dos 4% (v/p). Este rendimento em OE é muito satisfatório tendo em conta os valores de referência existentes (1 a 3%) (da Cunha *et al.*, 2007).

Tabela 11. Rendimentos em óleo essencial das hidrodestilações de eixos florais colhidos de plantas de *Lavandula angustifolia* cultivadas num campo experimental em Braga (Lamações).

Amostras frescas	Datas de recolha (dia e mês)	Peso fresco hidrodestilado (g)	Peso seco (g)	Peso do OE (g)	Volume aproximado (ml)	Rendimento (g OE/100g biomassa seca)	Rendimento (ml OE/100g biomassa seca)
Eixos florais	11-08-08	110,3	38,74	1,182	±1,4	3,0 %	± 3,6 %
	11-08-08	114,2	40,11	1,313	±1,6	3,3 %	± 4,0 %

Para além do OE de flores foi também efectado o isolamento e estudo da composição do OE acumulado pelos rebentos caulinares cultivados *in vitro* durante dezasseis semanas (tabela 12 e A1 dos anexos). A análise do OE proveniente de flores levou à detecção de quarenta e quatro compostos com teores acima de 0,05%, representando cerca de 98,4% do OE para além de mais de uma dezena de compostos cujos teores eram inferiores a 0,05%. (somatório das áreas dos picos detectados pelo FID).

Quanto ao OE de rebentos caulinares obtidos por micropropagação, 96,9% dos picos detectados corresponderam a compostos com teores acima de 0,05%. Este OE revelou-se mais complexo que o OE de flores das plantas *in vivo* (oitenta e quatro compostos) (tabela 12), tendo os perfis de composição apresentados diferenças significativas. Ambas as amostras caracterizaram-se pela elevada percentagem de monoterpenos oxigenados. O OE de culturas *in vitro* era, no entanto, mais rico em hidrocarbonetos monoterpénicos (11%) e sesquiterpenos (tabela 12).

Tabela 12. Caracterização dos óleos essenciais (OEs) extraídos de eixos florais de *Lavandula angustifolia* colhidos em Agosto de 2008 a partir de arbustos em plena floração num campo experimental em Lamações (Braga) e de rebentos caulinares cultivados *in vitro* em meio MS com BA (0,5 mg/l) durante dezasseis semanas de cultura.

Compostos	KI calc. ¹	Eixos florais	Rebentos caulinares <i>in vitro</i>
	GC (DB-5)	Teor relativo (%)	Teor relativo (%)
α -Tujeno	928	rd	0,1
α -Pino	935	0,1	1,2
Canfeno	950	0,1	0,4
Sabineno	978	rd	0,5
β -Pino	980	0,4	1,3
3-Octanona	987	rd	0,5
Mirceno	991	0,3	0,7
Acetato de hexilo	996	rd	...
α -Felandreno	1004	0,1	0,1
δ -3-Careno	1010	0,2	1,3
α -Terpineno	1014	rd	0,1
<i>o</i> -Cimeno	1023	rd	0,2
<i>p</i> -Cimeno	1028	0,7	0,6
Limoneno	1031	2,2	4,2
1,8-Cineole	1037	1,7	23,3
Z- β -Ocimeno	1047	0,2	0,1
E- β -ocimeno	1056	0,1	0,1
γ -Terpineno	1065	0,1	0,2
<i>cis</i> -Hidrato de sabineno	1070	...	0,2
Terpinoleno	1083	0,2	0,1
Terpinoleno	1090	...	0,2
Linalool	1100	54,6	0,3
<i>trans</i> -Tujona	1117	rd	...
Terpinen-1-ol *	1121	0,1	0,2
α - Canfolenal	1130	...	0,1
<i>trans</i> -Pinocarveol	1143	...	0,4
Cânfora	1141	11,0	15,2
<i>trans</i> -Verbenol *	1144	0,2	0,1
N.l.	1165	...	0,1
Pinocarvona	1167	...	0,8
Borneol	1164	5,1	10,9
Lavandulol	1168	1,3	...
N.l.	1177	...	0,4
Terpinen-4-ol	1177	7,9	0,9
<i>p</i> -Cimeno-8-ol	1184	0,2	0,1
α -Terpineol	1188	0,6	1,3
Butirato de hexilo	1193	0,6	...
Mirtenal	1199	...	1,5
Mirtenol	1202	...	0,8
<i>trans</i> -Carveol	1218	0,1	0,2
<i>cis</i> - Carveol	1226	0,1	0,1
N.l.	1232	...	0,8
<i>n</i> -hexil-2-metil-butanoato	1237	0,1	0,8
cuminil aldeído	1240	0,3	0,4
Isovalerato de hexilo	1243	0,1	...
Carvone*	1245	0,1	0,1
Acetato de linalilo	1260	3,8	...
Geranial	1275	...	0,2

Tabela 12. (Continuação)

Compostos	KL calc. ¹	Eixos florais	Rebentos caulinares
	GC(DB-5)	Teor relativo (%)	Teor relativo (%)
Perilla aldeído	1272	rd	0,1
Acetato de bornilo	1289	rd	0,1
Formato de geranilo	1293	1,4	...
Tiglatto de hexilo	1333	0,1	0,2
Acetato de nerilo	1367	0,1	...
β -Bourboneno*	1382	...	0,4
Acetato de geranilo	1385	0,2	0,1
Hexanoato de hexilo	1388	0,1	1,1
β -Elemene	1387	...	0,1
α -Gurjunene	1411	...	0,3
E-Cariofileno	1412	0,4	1,4
N.l.	1416	0,1	...
α -trans-Bergamoteno	1433	0,1	...
N.l.	1449	...	0,1
E- β -farneseno	1455	rd	...
γ -Elemeno*	1456	...	0,8
Z- β -farneseno	1458	22	...
Germacreno D isomer #1 *	1465	...	0,2
N.l.	1475	0,1	...
γ -Gurjuneno	1476	...	0,1
Germacreno D	1480	0,4	0,8
N.l.	1497	...	0,1
E-E- α -Farneseno	1507	0,1	...
Isobutirato de geranilo	1511	0,4	...
γ -Cadineno	1516	...	2,6
δ -Cadineno	1521	...	0,1
1R,trans ou cis-Calamene	1525	...	0,4
N.l.	1527	...	0,4
N.l.	1555	...	0,4
N.l.	1569	...	0,1
α -Cadinol isomer #1 *	1577	...	0,2
Óxido de cariofileno	1584	0,1	2,9
N.l.	1604	...	0,2
N.l.	1611	...	0,1
N.l.	1617	...	0,4
epi- α -Cadinol	1646	...	6,5
α -Cadinol	1657	...	0,2
N.l.	1666	...	0,1
Z- α -Santalol	1674	...	0,1
epi- α -Bisabolol	1686	...	0,3
N.l.	1689	...	0,8
Z-E-Acetato de farnesilo	1696	rd	...
N.l.	1717	...	0,1
N.l.	1748	...	0,2
N.l.	1889	...	0,2
N.l.	1924	...	0,1
N.l.	1955	...	0,2
N.l.	1969	...	0,2
N.l.	1975	...	3,6
N.l.	2007	...	0,3
N.l.	2214	...	0,2
N.l.	2208	...	0,4
N.l.	2220	...	0,1

Tabela 12. (Continuação)

Agrupamento dos constituintes	Eixos florais	Rebentos caulinares
	Teor relativo (%)	Teor relativo (%)
Hidrocarbonetos monoterpenénicos	4,8	11,2
Monoterpenos oxigenados	83,0	56,7
Monoterpenil ésteres	6,5	2,5
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos	3,1	6,1
Sesquiterpenos oxigenados	0,1	10,2
Sesquiterpenil ésteres	0,4	9,81
Quantificação total	98,4	96,9
Identificação total (%) ²	97,8	87,4

¹ Os valores de Índice de Kovats que constam foram determinado para a amostra de OE de rebentos caulinares. No caso de compostos presentes unicamente na outra amostra foram inseridos os respectivos KI.

² A percentagem de identificação representa a totalidade dos compostos quantificáveis e identificados tendo em conta o somatório dos respectivos teores.

N.I. Constituintes não identificados o por falta de semelhança com os espectros consultados ou propostas pouco plausíveis tendo em conta os KI.

rd Constituintes presente em teores inferiores a 0,05%

* Proposta de identificação dúbia e a considerar com reservas devido a esta se basear somente num dos critério de identificação ou devido à ausência de informação acerca dos KI,

... Composto não detectados na amostra

O OE de flores de *L. angustifolia* caracterizado era essencialmente composto por linalool (55%), um monoterpeno oxigenado (álcool terciário) característico das flores desta espécie. Este valor é ligeiramente superior ao divulgado por alguns autores (entre 35 a 50%) (Kim e Lee, 2002; Iriti *et al.*, 2006). O elevado teor em linalool é um dos parâmetros decisivos para o reconhecimento da qualidade do OE de alfavaca. Para além deste, o acetato de linalilo, um terpenil éster, é normalmente indicado pelos especialistas como o composto de maior destaque nas flores de *L. angustifolia*, devendo estar presente em teores entre 38 e 58% (valores definidos pela ISO) (Lis-Balchin, 2002). Porém, no caso do OE analisado, o teor encontrado para este constituintes foi muito inferior (4%), o que não é de todo incomum (tabela 1). A aplicação de métodos de hidrodestilação simples ou modificados, tem levado à determinação de valores percentuais de acetato de linalilo não muito afastado deste (entre 8 e 14%), não constando, por vezes, entre os três principais constituintes (Kim e Lee, 2002). Pelo contrário, o recurso a outros métodos que não envolvem água, designadamente a extracção supercrítica, tem permitido a obtenção de extractos voláteis extremamente ricos em acetato de linalilo (Kim e Lee, 2002; Reverchon e Della Porta, 1995). Para além do linalool foram igualmente detectados outros monoterpenos oxigenados em quantidades apreciáveis, designadamente a cânfora (11%), o terpinen-4-ol (8%) e o borneol (5%). A existência destes constituintes como maioritários têm sido frequentemente reportada, assim como de vários outros monoterpenil ésters para além do acetato de linalilo

(Reverchon e DellaPorta, 1995; Kim e Lee, 2002; Fakhari *et al.*, 2005; Chemat *et al.*, 2006; Iriti *et al.*, 2006). A composição do OE depende da variedade em estudo e dos diferentes quimiótipos possíveis de *L. angustifolia*. A composição qualitativa do OE de *L. angustifolia* estudado foi bastante semelhante à registada para o OE de plantas de *L. angustifolia* desenvolvidas na Grécia e na Turquia (Chatzopoulou e Goliaris, 1993; Yusufoglu *et al.*, 2004). O tipo químico caracterizado por estes últimos autores (45 % de linalool, 13% de cânfora, 9% terpinen-4-ol, 6 % de 1,8-cineole, 5 % de borneol e somente 3 % de acetato de linalilo) revelou-se muito aproximado ao quimiótipo aqui estudado.

Por outro lado, é de referir que o perfil de composição dos OEs das plantas de *L. angustifolia* em estudo se tem revelado muito estável ao longo dos anos, no decorrer de várias análises. Para este quimiótipo em particular, já foi constatado anteriormente que o OE de flores maduras, constituído essencialmente por linalool (52%), cânfora (10%), terpinen-4-ol (6%), 1,8-cineole (5%) and borneol (4%), é geralmente mais rico em linalool, terpinen-4-ol e acetato de linalilo do que as flores antes da floração (Sousa e Fernandes-Ferreira, 2007). Embora o perfil fitoquímico do OE proveniente deste quimiótipo não se encaixe nos parâmetros recomendados pela ISO para aplicações do OE de flores em cosmética, o valor medicinal ou pesticida deste OE pode ser considerável em razão do elevado teor de linalool.

Relativamente às culturas *in vitro* de rebentos caulinares desenvolvidos durante quatro meses, distinguiram-se como constituintes maioritários o 1,8-cineole (23%), a cânfora (15%), o borneol (11%) e o epi- α -cadinol (6.5%). Comparativamente com um estudo elaborado anteriormente com estas mesmas culturas *in vitro*, mantidas sob uma suplementa hormonal de BA superior (1mg/l) durante dois meses, os compostos maioritários foram coincidente. No entanto, verificaram-se diferenças importantes nos teores de cada um (Sousa e Fernandes-Ferreira, 2007). Assim, para os rebentos caulinares crescidos sob maior concentração de BA foram encontrados maiores teores de borneol (17%) e limoneno (9%) relativamente ao OE caracterizado no presente estudo. Por seu lado, o 1,8-cineole e a cânfora foram detectados em menores percentagens (15 e 8%, respectivamente) (Sousa e Fernandes-Ferreira, 2007). Embora a caracterização das partes vegetativas da planta *in vivo* não tenha sido contemplada neste trabalho, pode estabelecer-se uma comparação dos resultados obtidos *in vitro* com estudos anteriores. Foi já constatado, a partir de material vegetativo de *L. angustifolia*, que os constituintes maioritários nos OE das amostras de folhas de diferentes tipologias variam muito. Porém, foi possível distinguir a presença de 1,8-cineol, cânfora, limoneno e borneol (por ordem decrescente) entre os principais compostos (Sousa e Fernandes-Ferreira, 2007). Por seu lado, folhas de Alfazema ricas em 1,8-cineol (65%), borneol (12%) e cânfora (10%) foram analisadas por Hajhashemi e seus colaboradores (2003).

3.2.2. Caracterização dos OEs de *Foeniculum vulgare* var. *vulgare*

Os OEs de plantas de uma população espontânea de *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* obtidos por hidrodestilação das umbelas colhidas na fase de infrutescência em Outubro e Novembro de 2008, assim como de ramificações completas colhidas em Outubro e Novembro de 2008 e Março de 2009, proporcionaram rendimentos entre 2 e 5% (tabela 13)

Ao longo do processo de hidrodestilação (1h30 a 2h), registou-se um efeito relativamente pouco comum. No início da extracção as primeiras gotas de OE que se acumulavam no hidrodestilador eram totalmente transparentes e incolores, ao passo que a água condensada era bastante turva e translúcida (figura 30, a).

Ao fim de diversos ciclos de evaporação/arrefecimento e condensação da água do balão esta foi repetidamente entrando em contacto com o OE perdendo a sua turbidez até ficar totalmente transparente e incolor. Em contrapartida, o OE foi passando para um estado translúcido, esbranquiçado e turvo à semelhança ao da água nos primeiros ciclos (figura 30, b). Esta ocorrência foi registada para todas as extracções realizadas com material proveniente de funcho silvestre, tanto ramificações como umbelas com maior ou menor quantidade de biomassa para hidrodestilar. Embora não tenha sido realizada uma análise do EO ao longo da hidrodestilação, estas modificações deverão ser explicadas não somente pela formação de emulsões mas mais provavelmente pela elevada polaridade de alguns compostos, nomeadamente os fenilpropanoides (estragol, cis anetol/trans anetol) que, numa fase inicial da extracção, encontram mais afinidade com as moléculas de água, concentrando-se na fase aquosa.

O odor de ambos os tipos de OEs extraídos apresentava-se extremamente forte e relativamente desagradável quando comparado com o OE de funcho-doce, extraído e analisado por outros colaboradores do laboratório de Biologia vegetal. O odor fortemente anisado do OE de funcho-doce cultivado (var. *dulce*) foi facilmente distinguido do de OE obtido a partir da variedade *vulgare*. No caso

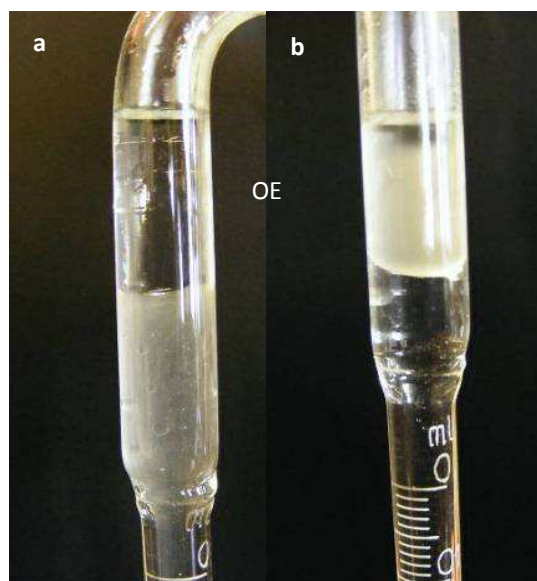


Figura 30. Fotografia ilustrando as diferenças visuais que foram observadas nas fases orgânicas (óleo essencial) e nas fases aquosas, no início (a) e final (b) da hidrodestilação, respectivamente.

particular do OE de frutos, embora ainda constituído por uma leve nota anisada, revelou-se como uma mistura predominantemente agressiva para o olfacto causando sensações desagradáveis após um curto período de exposição. Prevvia-se que esta distinção entre os dois OEs estivesse relacionada com a presença ou ausência de compostos com maior toxicidade como a fenchona, cânfora, entre outros compostos com efeitos neurotóxicos.

Tabela 13. Rendimentos em óleo essencial de hidrodestilações de funcho silvestre (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*) desenvolvido em população espontânea em S. Paio de Merelim (Braga).

Amostras frescas	Datas de recolha (dia, mês e ano)	Peso fresco hidrodestilado (g)	Peso seco (g)	Peso do OE (g)	Volume aproximado (ml)	Rendimento (gOE/100g biomassa seca)	Rendimento (ml OE/100g biomassa seca)
Umbelas	10-10-08	111,94	37,73	1,164	1,5	3,1%	± 4%
	23-11-08	100,5	36,88	1,030	1,1	2,8%	± 3%
Folhas e caules foliares	14-10-08	128,0	19,58	0,375	0,4	1,9%	± 2,0%
	11-03-09	250,0	26,63	1,303	1,4	4,9%	± 5,3%
	11-03-09	300,0	31,96	0,940	0,9	2,9%	± 2,8%

Para as diferentes tipologias de material foram efectuadas mais do que uma colheita no sentido de determinar valores de rendimento em OE (Tabela 13). Ambas as amostragens de infrutescências permitiram registar rendimentos muito satisfatórios. Por seu lado, as partes vegetativas apresentaram valores de rendimentos bem mais díspares. A colheita de Outono foi a que revelou menores rendimentos (2%). Apesar de esta espécie de funcho ser vivaz e não terminar o seu desenvolvimento após a formação dos frutos, a época mais rigorosa do ano não é favorável ao crescimento da planta. Já é do conhecimento comum de que os rendimentos da extracção de óleo sofrem uma grande variabilidade em resultado de factores climáticos/ambientais, estação da colheita, idade da planta e, no caso especial do funcho, após o amadurecimento dos frutos (Miraldi, 1999). Aparentemente a produção e acumulação de OE nas folhas deverá ter sofrido alguma redução após o período de infrutescência com a chegada do inverno, pois em Março a extracção do OE a partir do mesmo tipo de material (rebentos foliares) levou à determinação de rendimentos em OE bem superiores. Relativamente a estas amostras de OE extraídas no mesmo momento, é de notar que, embora muito satisfatórios, os rendimentos obtidos não foram concordantes (5 e 3% p/p). Apesar das duas hidrodestilações terem decorrido com o mesmo tipo de material e em simultâneo, supõe-se que o

próprio seccionamento do material tenha originado alguma heterogeneidade entre as biomassas utilizadas, resultando numa determinação tão distinta de rendimentos em OE. É provável que a hidrodestilação com maior rendimento, tenha incluído menos biomassa lenhosa, como a base dos caules, de maior calibre e peso seco e por esse motivo não necessariamente tão rentáveis.

Na produção industrial de funcho para extracção de óleo, a colheita e o processamento da planta inteira é geralmente feito por maquinaria de corte, não permitindo discriminar os caules das folhas ou das umbelas (Hulnaut *et al.*, 1989). De facto, embora os frutos possam conter um óleo de qualidade e em quantidade apreciáveis (2 a 6% do peso fresco) (Hulnaut e Du Manoir, 1992), o reduzido peso das umbelas relativamente à planta inteira (2 a 9%) (Piccaglia e Maroti, 2001) torna a separação manual destas estruturas economicamente desvantajosa. Seguindo esta perspectiva e fazendo um balanço entre todos os valores obtidos, admite-se que o rendimento de toda a planta atinja valores concordantes com os valores mínimo proposto pela farmacopeia Portuguesa que é de 40 ml de OE por kg de planta seca (Barbosa *et al.*, 2007). É de destacar que este rendimento é consideravelmente superior ao que se pode obter com o funcho-doce (20 ml/kg planta seca), sendo mais uma das razões pela qual se deu prevalência à variedade *vulgare* para os estudos realizados neste trabalho, em detrimento da variedade *dulce*.

As amostras de OE obtido de plantas *in vivo* e *in vitro* foram analisadas e encontram-se caracterizadas qualitativa e quantitativamente na tabela 14 e tabela A2 dos anexos. O estudo da composição do OE de infrutescências de funcho silvestre permitiu a identificação e quantificação de dezassete compostos (oito maioritários e nove minoritários), constituindo 99,5 % do OE. Para além destes, cerca de mais onze compostos, cujo teor não foi quantificado por se tratarem já de compostos residuais, puderam ser identificados, perfazendo praticamente a totalidade do OE. Quanto ao OE de ramificações (rebentos caulinares e folhas), foram quantificados vinte constituintes principais (oito maioritários e doze minoritários) representando 99,0% do OE. Para além destes, outros compostos com teores relativos abaixo de 0,05% foram identificados. Apesar de dois dos compostos principais não terem ficado efectivamente identificados, dezoito compostos acrescidos de sete outros constituintes residuais, foram apresentados com propostas de identificação muito prováveis (vinte e cinco no total), ficando identificado mais de 98,8 % do OE. Surpreendentemente, o OE extraído de culturas *in vitro* de funcho apresentou maior variedade de compostos, trinta e sete no total (tabela 14 e A2 dos anexos). Onze desses compostos maioritários representaram 98,9 % de todo o óleo produzido nessas condições.

Como pode ser visto na tabela 14, o OE de infrutescências de *F. vulgare* var. *vulgar* era maioritariamente constituído por um conjunto de três compostos: o estragole (53%), a fenchona (17%) e o *trans*-anetole (14%). As partes vegetativas da planta revelaram teores de estragole ligeiramente superiores (58%) mas com uma redução drástica nos teores de fenchona (8%) e *trans*-anethole (4%). Nesta amostra, o segundo composto maioritário identificado foi o α -Felandreno (12%) em vez da fenchona (8%) que passou para terceiro composto maioritário.

Os resultados obtidos neste trabalho são concordantes com os divulgados por Muckensturm e colaboradores (1997) que caracterizaram três possíveis tipos químicos de OEs no seio da variedade *vulgare*. Segundo este estudo, a composição dos frutos com teores de estragole entre 50 a 60% permite incluir os exemplares analisados na variedade *vulgare* enquanto a existência de estragole acima de 40% no óleo de folhas indica que estaremos perante o respectivo quimiótipo dominante. Relativamente a esta espécie, encontram-se diversos estudos dedicados à caracterização do OE, diferenciação de variedades e quimiótipos de funcho (Muckensturm *et al.*, 1997; Miraldi, 1999; Piccaglia e Marotti, 2001; Barazani *et al.*, 2002).

Os teores de *trans*-anetole, estragole e fenchona têm constituído o critério determinante para distinguir a variedade doce (*dulce*) da amarga (*vulgare*). O *trans*-anetole, de sabor anisado e doce, tem sido apontado como o principal composto do óleo de funcho-doce, representando mais de 80%. A presença de fenchona (percentagens superiores a 15 %) tem sido indicada, como decisivo na identificação da variedade amarga, devido ao carácter pungente e canforeaceo que este composto confere ao OE (Miraldi, 1999). Porém, as indicações das farmacopeias acerca das variedades são bastante divergentes sendo que algumas nem estabelecem distinções fitoquímicas (Miraldi, 1999). A maioria dos investigadores encaram a predominância do estragol e/ou da fenchona relativamente ao anetole como uma característica distintiva da variedade *vulgare*, embora outros compostos como o α -felandreno, estejam presentes em elevadas quantidades, podendo contribuir para o sabor amargo e o aroma pungente desta variedade. Apesar destas tentativas de definir critérios, constata-se que a razão entre estes três compostos é sempre muito variável entre os diversos estudos e que, como sugerem Piccaglia e Marotti (2001), existe uma forte possibilidade de ocorrerem polinizações cruzadas e hibridação entre as variedades cultivadas e as naturais da região mediterrânea.

Tabela 14. Caracterização dos óleos essenciais (OEs) de infrutescências frescas (frutos e umbelas) e partes vegetativas de *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* colhidas em Outubro de 2008 numa população silvestre crescida em S. Paio de Merelim (Braga) e de plântulas germinada e cultivada *in vitro* em meio MS durante doze semanas.

Compostos	KI calc. ¹	Infrutescências	Folhas e caules jovens	Plântulas <i>in vitro</i>
	GC (DB-5)	Teor relativo (%)	Teor relativo (%)	Teor relativo (%)
α -Tujeno	929	rd	0,1	0,1
α -Pino	936	3,3	5,9	3,7
Canfeno	951	0,2	0,1	rd
Sabineno	975	0,3	0,4	0,2
β -Pino	978	1,3	0,4	0,4
Mirceno	991	1,1	2,0	1,2
α -Felandreno	1005	5,1	11,5	31,2
α -Terpineno	1017	rd	0,1	0,1
<i>ortho</i> -Cimeno	1025	0,1	0,1	1,1
β -Felandreno	1030	3,0	6,8	9,2
1,8- Cineole	1035	0,7
z- β -ocimene	1040	0,2	1,6	1,2
E- β -ocimene	1050	rd	0,1	0,1
γ -terpinene	1060	0,3	0,2	3,2
<i>l</i> -Hidrato de Sabineno*	1071	rd
Terpinoleno + 2,5-dimetil estireno	1088	0,3
Fenchona	1090	17,0	7,7	...
Linalool	1100	0,0
Undecano	1100
Isopentenilo de isovalerato	1107	...	rd	...
Fenchol	1116	rd	rd	...
1,3,8 <i>p</i> - mentatrieno	1122	rd
exo-Fenchol	1121	rd	rd	...
cis- <i>p</i> - Ment-2-en-1-ol*	1125	rd	rd	...
allo -Ocimeno*	1131	rd	0,2	0,1
Cânfora	1149	0,2	0,1	...
Terpinen-4-ol	1180	0,1	0,1	...
Estragole	1196	52,6	57,7	15,2
N.I.	1203	0,2
Acetato de fenchilo (endo)	1220	0,6
Acetato de fenchilo (exo)	1234	0,1
N.I.	1252	0,7
trans-Anetole	1284	13,9	3,8	20,6
Tridecano	1300	...	0,1	0,08
N.I.	1306
β -Elemene	1395	0,1
Metil eugenol	1400	rd	...	0,1
Metil eugenol	1404	...	rd	0,1
E-Cariofileno	1413	...	rd	0,2
E- β -farnesene	1460	0,1
γ - Muuruleno ou γ - Gurjuneno*	1478	0,2

Tabela 14. (Continuação)

Compostos	KI calc. ¹	Infrutescências	Folhas e caules jovens	Plântulas <i>in vitro</i>
	GC (DB-5)	Teor relativo (%)	Teor relativo (%)	Teor relativo (%)
Germacreno D	1480	0,3
β-Selinene	1484	0,1
E,E-α-Farnesene	1508	0,1
Miristicina	1521	rd	rd	0,1
δ-Cadineno*	1521	1,2
Elemicina	1562	rd
Dill apiole	1621	1,1
Apiole	1679	4,5
2-Metil- octadecino*	1841	0,2
N.I.	1864	0,1
Agrupamento dos constituintes				
Hidrocarbonetos monoterpênicos		14,8	29,5	52,0
Monoterpenos oxigenados		18,2	7,9	0,7
Fenilpropanóides		66,4	61,5	42,4
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		0,0	0,0	2,3
Outros		0,0	0,2	1,0
Quantificação total		99,5	99,0	98,3
Identificação total (%) ²		99,5	98,8	96,2

¹ Valores de Índice de Kovats que constam foram determinado para a amostra de OE de plântulas de funcho *in vitro*. No caso de compostos presentes unicamente na outra amostra *in vivo* foram inseridos os respectivos KI.

² A percentagem de identificação representa a totalidade dos compostos quantificáveis e identificados tendo em conta o somatório dos respectivos teores.

N.I. Constituintes não identificados o por falta de semelhança com os espectros consultados ou propostas pouco plausíveis tendo em conta os KI.

rd Constituintes presente em teores inferiores a 0,05%

* Proposta de Identificação dúbia e a considerar com reservas devido a esta se basear somente num dos critério de identificação ou devido à ausência de informação acerca dos KI,

... Composto não detectados na amostra

Tal facto foi anteriormente estudado por Badoc e colaboradores (1995), que demonstraram o quanto se pode revelar difícil uma tentativa de distinção entre a variedade *vulgare* e *dulce* no seio de populações com grande variabilidade. A existência de um quimiótipo dominante em estragol e outro em anetole tem sido reconhecido por alguns autores (Barazani *et al.*, 2002). À semelhança de outras populações naturais com elevado teor de estragol (50-65%) caracterizadas em várias zonas de Portugal (Cavaleiro *et al.*, 1993) e tendo em conta o que foi determinado por Muckensturm e seus colaboradores (1997), a população estudada no âmbito deste trabalho parece ajustar-se ao quimiótipo estragole.

No que diz respeito ao agrupamento dos compostos, uma comparação entre os OEs de infrutescências, partes vegetativas e plantas *in vitro* permitiu-nos verificar uma diminuição do teor total

dos monoterpenos oxigenados (18, 8 e 0,7% respectivamente) e dos fenilpropanoides (66, 62 e 42% respectivamente) em correlação com um aumento dos hidrocarbonetos monoterpênicos (15, 30 e 62%, respectivamente). A prevalência do grupo dos hidrocarbonetos monoterpênicos nas plantas *in vitro* em relação aos monoterpenos oxigenados, representados principalmente pela fenchona nos OEs *in vivo*, é certamente a diferença de maior destaque. O mesmo facto, já fora descrito anteriormente para culturas *in vitro* de funcho da mesma variedade, após uma cultura de 30 dias (Lamarti *et al.*, 1993a). Adicionalmente, atribui-se alguma relevância quanto à produção *in vitro* de uma maior variedade de fenilpropanoides (miristicina, dill apiole e apiole), ainda que a percentagem total deste grupo permanecesse inferior relativamente às amostras *in vivo*. Do mesmo modo, Lamarti e colaboradores (1993), identificaram uma grande variedade de fenilpropanoides nas plântulas *in vitro* (nove compostos). No entanto, o teor total deste grupo de compostos foi significativamente superior (75%) ao que foi determinado no nosso estudo (42%) especialmente pela predominância do dillapiole (55%), um composto identificado como maioritário das raízes (Muckensturm *et al.*, 1997). Por outro lado, registou-se uma redução muito significativa da produção de estragol na amostra *in vitro* (15%), Porém, ao invés, a acumulação de *trans*-anetole nas plantas jovens de culturas *in vitro* foi relativamente satisfatória (21%) e superior à produção *in vivo*. Na medida em que os esclarecimentos existentes nesta matéria da biossíntese e acumulação destes compostos são ainda muito insuficientes, torna-se difícil sugerir uma possível explicação. No entanto, o trabalho de Gross e seus colaboradores (2002) ajudou a elucidar a questão da produção de estragol e *trans*-anetole na planta de funcho amargo, relacionando-a com a actividade das *O*-metiltransferases. Estes autores verificaram, em diversas situações (*in vivo* e *in vitro*) e com quimiótipos diferentes, que as actividades enzimáticas das duas *O*-metiltransferases responsáveis pelas metilações do chavicol a estragole (metilchavicol) e do *t*-anol a *t*-anetole eram muito semelhantes, não podendo ser único factor determinante na diferenciação de quimiótipos.

Sabe-se que alguns compostos presentes nas amostras, como a fenchona, o estragole e o *cis*-anetole (residual) possuem uma toxicidade comprovada (Da Cunha *et al.*, 2007; Badoc *et al.*, 1995), enquanto outros, como o *trans*-anetole, têm um forte papel atractivo nos insectos polinizadores (Barazani *et al.*, 2002). Tendo em conta estes aspectos, prevê-se que os óleos obtidos *in vivo* possam revelar algumas potencialidades pesticidas.

3.2.3. Caracterização dos OEs de *Petroselinum crispum* ssp. *neapolitanum*

A hidrodestilação de estruturas vegetativas de *P. crispum* proporcionou rendimentos de OE entre 0,3 a 0,5%, ao passo que com as umbelas com infrutescências foi obtido um rendimento superior a 1% (tabela 15). O OE resultante das infrutescências apresentou um odor fortíssimo e extremamente desagradável muito distinto do odor exalado pelas folhas da planta. Os rendimentos obtidos são inferiores aos divulgados para três cultivares da variedade de folha lisa (1,5 a 2,2%) (Kurowska e Gałazka, 2006) sendo, porém, concordantes com os descritos num estudo elaborado com 104 amostras de uma colecção de germoplasma de salsa com diferentes origens, cujo valor médio foi de 0,07% volume/peso fresco (Simon e Quinn, 1988).

Tabela 15. Rendimentos em óleo essencial das hidrodestilações de plantas de *Petroselinum crispum* spp. *neapolitanum* (salsa) em cultivo no campo.

Amostras frescas	Datas de recolha (dia, mês e ano)	Biomassa fresca hidrodestilada (g)	Peso seco (g)	Peso de OE (g)	Volume aproximado (ml)	Rendimento (g OE/100g biomassa seca)	Rendimento (ml OE/100g biomassa seca)
Umbelas	25-08-08	84,99	33,196	0,422	± 0,41	1,3 %	± 1,2 %
	8-12-08	150,0 163,8	23,41 25,57	0,150	± 0,125	0,31 %	± 0,25 %
Folhas, caules e rebentos	9-03-09	284,0	45,57	0,234	± 0,19	0,51 %	± 0,42 %
	18-05-09	225,0 145,0	32,99 29,51	0,145 0,157	± 0,14 ± 0,15	0,44 % 0,53 %	± 0,42 % ± 0,51 %

Os OEs recolhidos de hidrodestilações realizadas em duplicado foram colocados num único vial para proceder à pesagem e medição do volume.

A caracterização dos OEs para as diversas amostras de *Petroselinum crispum* spp. *neapolitanum* encontra-se descrita na tabela 16 e na tabela A3 dos anexos. Para o OE de infrutescências de salsa isolado foram detectados e identificados oito constituintes maioritários (de percentagem superior a 1%) e dezasseis minoritários (de percentagem inferior a 1% e superior a 0,05%), perfazendo no total 98,9% do OE. A restante percentagem corresponde a constituintes presentes em quantidades vestigiais (0,05%). Deste modo, a determinação qualitativa do OE resultou na identificação de trinta e três compostos no total.

3. Resultados e Discussão

Tabela 16. Caracterização dos óleos essenciais (OEs) de *Petroselinum crispum* spp. *neapolitanum* extraído de amostras de plantas cultivadas em campo (infrutescências e partes vegetativas) e plântulas germinadas e desenvolvidas *in vitro* em meio MS durante doze semanas.

Compostos	KI calc. ¹	Infrutescências	Partes vegetativas	Partes vegetativas (Vila Real)	Plântulas <i>in vitro</i>
	GC-MS	Teor relativo (%)	Teor relativo (%)	Teor relativo (%)	Teor relativo (%)
α -Tujeno	929	0,1	rd	rd	rd
α -Pino	937	12,8	2,34	1,84	0,4
Canfeno	950	0,1	rd	rd	rd
Sabineno	975	0,6	0,08	0,09	0,2
β -Pino	979	12,5	1,13	0,81	0,4
Mirceno	992	2,1	8,86	6,21	7,0
α -Felandreno	1005	0,4	0,85	0,72	1,4
δ -3-Careno	1013	rd	rd
α -Terpineno	1017	rd	0,13	rd	rd
<i>ortho</i> -Cimeno	1025	0,1	0,13	0,19	0,1
β -Felandreno	1030	5,5	10,18	6,54	27,2
z - β -Ocimeno	1040	rd	rd	0,11	...
E- β -ocimeno	1051	0,52	rd
γ -Terpineno	1060	rd	0,10	0,19	0,2
Terpinoleno + 2,5 dimetil estireno	1090	1,6	12,45	...	1,0
Terpinoleno +1-metil-4-isopropenilbenzeno	1092	12,43	...
Linalool	1100	0,1
2-metil-2-propenil fenol*	1100	0,07	...
1,3,8 p -mentatrieno	1113	13,2	47,42	44,65	1,0
α -Alilfenol *	1123	...	0,06
<i>allo</i> -Ocimene*	1132	0,1	...
3-etenil-1,2-dimetil-1,4-ciclohexadieno*	1135	0,1	0,53	0,43	...
N.I.	1140	...	0,08	0,08	...
<i>trans</i> -3-careno-2-ol*	1161	...	0,08
<i>cis</i> -Carveol	1174	...	0,06
Terpinen-4-ol	1176	0,1	rd
p cymen-8-ol	1186	rd	0,19
3 ou 4-Metilacetofenona	1188	0,29	...
α -Terpineol	1190	rd	0,21
Dihidrocarveol *	1190	0,1
N.I.	1191	0,19	...
N.I.	1189	...	0,08
Mirtenal	1193	0,8	0,05	0,19	...
N.I.	1198	...	0,08	0,09	...
Estragole	1200
N.I.	1203	...	0,12
<i>n</i> -Decanal	1206	rd
1-Hidroximetil-4-isopropilbenzeno	1222	...	2,63	3,06	...
<i>trans</i> -3-Caren-2-ol *	1223	0,1
N.I.	1231	...	0,17	...	0,2
Pulegona*	1236	0,09	...
Acetato de mirtenilo*	1238	rd	0,08	0,08	...

Tabela 16. (Continuação)

Compostos	KI calc. ¹	Infrutes- cências	Partes vegetativas	Partes vegetativas (Vila Real)	Plântulas <i>in vitro</i>
	GC-MS	Teor relativo (%)	Teor relativo (%)	Teor relativo (%)	Teor relativo (%)
Éster metílico de carvacrol	1245	0,1	0,1	0,1	...
Eucarvona ou 6-Canfenona*	1257	0,1	...
N.I.	1270	...	0,1	0,1	...
Acetato de Bornilo	1285	0,2
N.I.	1286	...	0,7	1,0	...
Tridecano	1300	0,1
N.I.	1311	...	0,5	0,1	...
N.I.	1323	0,1	1,4	2,0	...
N.I.	1364	...	0,1	0,1	...
N.I.	1370	0,1	...
α -Copaeno	1376	rd	0,1	0,1	rd
N.I.	1379	...	0,1	0,1	...
β -Elemeno	1388	rd	0,1	rd	0,1
β -Cubebeno	1389	...	0,9	0,1	...
β -Elemeno*	1397	...	0,7	0,2	...
2-naphtol, 1,2,3,4a,5,6,7 octahydro-4a-methyl *	1403	1,1	...
Metil eugenol	1410	0,1	...
E-Cariofileno	1413	0,1	0,3	0,3	0,2
β -Gurjuneno	1430	rd	...	rd	...
α -trans-Bergamoteno	1434	0,1
<i>allo</i> -Aromadendreno	1452	...	rd	rd	...
E- β - Farnesene	1458	2,2
γ - Gurjunene	1476	...	0,5
Germacreno D	1475	rd	0,2	0,6	0,6
N.I.	1483	0,6
8S,14- Cedran-diol *	1493	...	0,1	0,2	...
α -Zingibereno	1493	0,2
γ -Elemeno	1495	...	0,1
α -Muuroleno	1497	0,1	...
β-bisaboleno	1506	1,2
Miristicina	1519	0,1	0,8	2,9	0,3
N.I.	1521	...	0,3
β- Sesquifelandreno	1523	16,4
8S,14- Cedran-diol *	1550	...	0,1	0,3	0,3
Elemicina	1559	0,4	...	rd	0,1
Carotol	1596	rd	...	0,1	0,2
1-Alil-2,3,4,5- tetrametoxibenzeno	1609	34,4	...	0,1	0,2
Dillapiole	1629	0,1
epi- α -Cadinol	1637	rd	0,1
N.I.	1648	rd	0,1	0,1	...
Apiole	1690	13,8	2,5	8,4	35,0
Benzoato de benzilo	1757	...	rd	0,1	0,1
N.I.	1840	0,3
N.I.	1980	0,1	...

Tabela 16. (Continuação)

Agrupamento dos constituintes	Infrutescência s	Partes vegetativas	Partes vegetativas (Vila Real)	Plântulas <i>in vitro</i>
	Teor relativo (%)	Teor relativo (%)	Teor relativo (%)	Teor relativo (%)
Hidrocarbonetos monoterpenénicos	48,9	83,7	74,3	38,8
Monoterpenos oxigenados	1,0	0,6	0,3	0,4
Sesquiterpenos	0,2	3,0	1,4	20,8
Fenilpropanóides	48,3	6,0	15,9	35,7
Outros	0,4	4,4	6,1	2,0
Quantificação total	98,9	97,7	98,0	97,7
Identificação total (%) ²	98,7	93,2	92,0	96,1

¹Valores de Índice de Kovats que constam foram determinado para a amostra de OE de plântulas de funcho *in vitro*. No caso de compostos presentes unicamente na outra amostra *in vivo* foram inseridos os respectivos KI.

² A percentagem de identificação representa a totalidade dos compostos quantificáveis e identificados tendo em conta o somatório dos respectivos teores.

N.I. Constituintes não identificados o por falta de semelhança com os espectros consultados ou propostas pouco plausíveis tendo em conta os KI.

rd Constituintes presente em teores inferiores a 0,05%

* Proposta de Identificação dúbia e a considerar com reservas devido a esta se basear somente num dos critério de identificação ou devido à ausência de informação acerca dos KI,

... Composto não detectados na amostra

As análises realizadas para as amostras de partes vegetativas de salsa (rebentos caulinares e folhas) levaram à detecção de quarenta e sete e cinquenta e quatro constituintes com nove e onze compostos predominantes, respectivamente enquanto a caracterização qualitativa dos OEs conduziu à identificação de cerca de vinte e oito compostos correspondendo a 93% e 92,0 % dos OEs.

No que diz respeito à composição do óleo extraído de plantas de salsa *in vitro* foram detectados trinta e nove compostos, sendo que trinta deles foram identificados (96 %). Destacaram-se nove constituintes maioritários (teor acima 1%), todos eles identificados.

As infrutescências diferenciaram-se das restantes tipologias de material pela presença abundante de um fenilpropanoide muito característico desta espécie: o 1-alil-2,3,4,5-tetrametoxibenzeno. Os OEs de folhas e caules da planta *in vivo* eram maioritariamente constituídos por 1,3,8-*p*-mentatriene (47 e 45%) enquanto as plantas ainda jovens cultivadas *in vitro*, revelaram o maior conteúdo em apiole (35%) e um elevado teor em β -Felandreno (27%). A composição do OE de plântulas *in vitro* foi distinta da dos OEs de estruturas vegetativas de plantas *in vivo*, essencialmente devido à presença de β -Felandreno e apiole e de sesquiterpenos maioritário como o E- β -farneseno, β -bisaboleno e β -sesquifelandreno, entre outros compostos. Porém, o 1,3,8-*p*-mentatrieno, considerado

por alguns autores como o composto mais característico e genuíno do aroma das folhas frescas (Masanetz e Grosch, 1998), não foi encontrado em quantidades consideradas apreciáveis.

No caso específico dos OEs de frutos, uma elevada presença dos monoterpenos e fenilpropanoides e uma quase ausência de monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos, é frequente (Kurowska e Gałazka, 2006). A existência relativamente abundante do fenilpropanóide 1-allil-2,3,4,5-tetrametoxibenzeno parece ser exclusivo de amostras de frutos embora para algumas cultivares de salsa não se encontre sequer presente nas infrutescências ou em teores considerados relevantes (Lamarti *et al.*, 1993b). O OE de infrutescências analisado foi considerado muito semelhante ao caracterizado por Lamarti e colaboradores (1993b), à exceção do elevado teor em miristicina na amostra estudado por estes (25%). Vários autores têm vindo a constatar que o OE das folhas difere essencialmente do dos frutos pelo facto de não apresentar 1-allil-2,3,4,5-tetrametoxibenzeno mas incluir o 1,3,8-*p*-mentatrieno como um dos maioritários (Lamarti *et al.*, 1993b; Petropoulos *et al.*, 2004). Este último composto, pouco usual e único nas plantas, é específico de Apiaceae sendo considerado o composto responsável pelo odor característico da salsa cortada (Díaz-Maroto *et al.*, 2002). Díaz-Maroto e colaboradores (2002) conseguiram relacionar a elevada perda de odor que ocorre nas folhas de salsa após secagem ou armazenamento com a diminuição rápida do 1,3,8-*p*-mentatriene em consequência da sensibilidade deste composto à luz. A caracterização do OE de salsa proveniente de vários países levou igualmente à distinção de 1,3,8-*p*-mentatrieno, miristicina, β -felandreno, mirceno e 1-metil-4-isopropenilbenzeno com terpinolene como compostos mais abundantes entre diversas amostras (Simon e Quinn, 1988). Por outro lado, Petropoulos e seus colaboradores (2004), verificaram os efeitos que a tipologia de tecidos, o estágio de desenvolvimento e a época de cultivo podem ter na variabilidade dos constituintes maioritários dos OEs de *P. crispum*.

3.2.4. Caracterização dos OEs de *Anethum graveolens*

A pequena quantidade de material de *Anethum graveolens* disponível para hidrodestilação, não proporcionou quantidades de OE suficiente para ensaios de actividade biológica nem para determinação de rendimentos, mas apenas para estudos de composição e quantificação pelo método do padrão interno.

As análises cromatográficas da amostra proveniente de plantas *in vivo* e de plantulas *in vitro* revelaram composições distintas (tabela 17 e tabela A4 dos anexos). No hidrodestilado (OE) de plantas *in vivo* foram detectados vinte e três compostos cujos teores relativos eram superiores a 0,05%, sendo que 98% deste OE foi identificado (dezasseis compostos). No hidrodestilado de plântulas *in vitro* foram detectados vinte e cinco constituintes, vinte e um dos quais foram identificados perfazendo igualmente 98% do OE. Para além dos constituintes principais detectados acima de 0,05%, vários outros compostos, presentes em teores inferiores a esse valor, puderam ser identificados.

As composições completas dos OEs das plantas *in vivo* e plântula *in vitro* de *A. graveolens* analisados neste trabalho, encontram-se descritas na tabela 17. O OE das partes vegetativas de plantas de *A. graveolens in vivo* era essencialmente constituído por α -felandreno, dill éter e β -felandreno enquanto as plantas *in vitro* possuíam uma quantidade muito elevada de α -felandreno. À excepção deste último composto e do α -felandreno, os restantes compostos maioritários (miristicina, dillapiole e apiole) foram característicos da amostra de plântulas de aneto cultivadas *in vitro*. Assim, a abundância do grupo dos fenilpropanoides é a diferença mais notória entre as duas amostras.

A composição dos OEs das plantas *in vivo* aqui em estudo é coerente com a divulgada por outros autores, designadamente Santos *et al.* (2002) e Huopalahti e Linko (1983). Porém, a ausência do dill éter, composto também conhecido como 3,6-dimetil-2,3,3a,4,5,7a-hexahidrobenzofurano, na amostra *in vitro*, constitui uma surpresa pois este tem sido apontado como um dos principais constituintes do OE desta espécie em conjunto com o α - e β -felandreno, limoneno, *p*-cimeno e carvona (Huopalahti e Linko, 1983). Sabe-se contudo, que nesta espécie podem ocorrer variações drásticas nos teores dos seus constituintes ao longo de desenvolvimento da planta, estado de maturação, métodos de extracção do óleo (Huopalahti e Linko, 1983) e métodos de secagem do material (Huopalahti e Kesälahti, 1985). Um estudo de composição do OE da planta permitiu constatar um aumento muito significativo do limoneno, dill éter e carvona ao longo do crescimento desta até à fase de floração (Huopalahti e Linko, 1983). A demonstração desta variação permite-nos compreender um pouco

melhor e considerar este aspecto do desenvolvimento como uma possível justificação para a ausência deste composto em plântulas *in vitro* com dez semanas de desenvolvimento. De facto, num estudo da planta de aneto e suas raízes elaborado por Santos *et al.* (2002), o dill éter foi detectado em quantidades bastante reduzidas (menos de 2%) não tendo sido, no entanto, indicado a idade ou o estado de maturação das plantas (Santos *et al.*, 2002).

Tabela 17. Caracterização do óleo essencial (OE) de uma amostra de partes vegetativas de plantas de *Anethum graveolens* cultivadas *in vivo* pela Empresa Ervas Finas (Vila Real) e do OE extraído de plântulas obtidas por germinação *in vitro* de sementes comerciais e desenvolvidas em meio MS durante doze semanas.

Compostos	KI calc. ¹	Folhas e caules	Plântulas <i>in vitro</i>
	GC (DB-5)	Teor relativo (%)	Teor relativo (%)
Nonano	900	...	0,2
α -Tujeno	932	0,3	0,2
α -Pino	941	1,6	0,8
Canfeno	957	rd	rd
Sabineno	982	0,1	0,1
β -Pino	986	0,1	0,1
Mirceno	1000	0,6	0,4
α -Felandreno	1020	67,3	30,6
α -Terpineno	1029	0,3	0,1
<i>para</i> -Cimeno	1034	0,4	1,6
β -Felandreno	1042	11,2	5,7
<i>z</i> - β -Ocimeno	1045	rd	0,1
<i>E</i> - β -Ocimeno	1055	0,1	rd
γ -Terpineno	1065	rd	rd
Terpinoleno + 2,5-Dimetil estireno	1092	0,1	0,1
Undecano	1000	...	1,2
<i>n</i> -Nonanal	1106	rd	...
1,3,8- <i>p</i> -Mentatrieno	1114	rd	...
<i>p</i> -Ment-2-en-1-ol	1125	rd	rd
3,4-Dimetilo-2,4,6-octatrieno*	1131	...	rd
Alocimeno*	1133	rd	...
Pentil benzeno	1161	...	rd
N.l.	1179	...	0,1
N.l.	1185	...	0,1
Dill éter	1194	14,6	...
<i>cis</i> -Piperitol	1199	0,1	...
Estragol	1200	rd	...
Dodecano + <i>cis</i> -Anetole	1201	...	rd
<i>trans</i> -Piperitol	1210	rd	...
Éter metílico de Timol	1238	...	rd
Éter metílico de Carvacrol	1247	...	rd
Piperitone	1259	rd	...
<i>Z</i> -Citral (neral)	1276	rd	...
(-) Acetato de Bornilo	1289	rd	rd
Tridecano	1300	...	0,2

Tabela 17. (Continuação)

Compostos	KI calc. ¹	Folhas e caules	Plântulas <i>in vitro</i>
	GC (DB-5)	Teor relativo (%)	Teor relativo (%)
<i>cis</i> - Acetato de carvilo	1366	...	rd
α - Copaeno	1378	rd	...
β - Elemeno	1392	...	rd
Metil eugenol	1410	rd	...
N.I.	1419	...	0,1
β - Gurjuneno	1431	rd	rd
Germacreno D	1483	0,1	0,2
Miristicina	1527	0,3	35,0
Elemicina	1561	...	0,1
Hexadecano	1600	...	rd
Dillapiol	1632	...	10,2
Δ - Cadinol	1645	rd	...
α - ou β -Eudesmol	1656	...	0,1
α - ou γ - Cadinol	1658	0,1	...
Apiol	1689	...	10,7
N.I.	1780	0,5	...
N.I.	1812	0,1	...
3- ou 9-Octadecino	1841	0,2	...
N.I.	1958	...	0,1
N.I.	1962	...	0,1
N.I.	1969	0,1	...
Falcarinol	2037	...	0,9
N.I.	2635	0,2	...
N.I.	2696	0,1	...
N.I.	3090	0,4	...
Agrupamento dos constituintes			
Hidrocarbonetos monoterpenénicos		82,0	39,6
Monoterpenos oxigenados		14,7	0,0
Sesquiterpenos totais		0,2	0,3
Fenilpropanóides		0,3	56,9
Outros		1,5	1,9
Quantificação total		98,8	98,7
Identificação total (%) ²		97,9	98,3

¹ Valores de Índice de Kovats para a coluna DB-5 determinado para a amostra de OE de plântulas *in vitro*. No caso de compostos presentes unicamente na outra amostra foram inseridos os respectivos KI.

² A percentagem de identificação representa a totalidade dos compostos quantificáveis e identificados tendo em conta o somatório dos respectivos teores.

N.I. Constituintes não identificados o por falta de semelhança com os espectros consultados ou propostas pouco plausíveis tendo em conta os KI.

rd Constituintes presente em teores inferiores a 0,05%

* Proposta de Identificação dúbia e a considerar com reservas devido a esta se basear somente num dos critério de identificação ou devido à ausência de informação acerca dos KI,

... Compostos não detectados na amostra

3.3. Estudo do efeito larvicida de OEs de *L. angustifolia* F. *vulgare* var. *vulgare*, *P. crispum* spp. *neapolitanum* contra *Anopheles atroparvus*

3.3.1. Ensaios preliminares

3.3.1.1. Escolha do agente emulsionante, avaliação da capacidade emulsionante e toxicidade nas larvas

Para avaliar a solubilidade dos OEs nestes “solventes” efectuaram-se misturas de OE/etanol e OE/*Tween*® 20 e posteriormente uma diluição em água. No primeiro passo, não se verificaram alterações no aspecto nem separação de fases. Contudo, a adição de um pouco de água nos aliquotas provocou uma turbidez acentuada nas misturas com etanol sendo visivelmente maior com o aumento da percentagem de etanol (mistura 1:8 muito turva). À medida que se ia aumentando a diluição o efeito túrbido não se atenuou. Pelo contrário, as misturas com *Tween*® 20 permaneceram transparentes desde o início, embora a formação de alguma espuma fosse evidente. Não se registou separação de fases mas apenas acumulação de espuma à superfície provocada pela leve agitação. Após algumas horas de repouso, observaram-se todas as soluções à lupa. A observação das soluções contendo etanol confirmou a presença de gotículas de diâmetro muito reduzido igualmente dispersas pela solução, incluindo à superfície. Em contrapartida as soluções de óleo com *Tween*® 20 continuaram nítidas tanto a olho nu como à lupa. Não foram encontradas gotas de OE, levando-nos a crer que a dispersão foi eficaz e homogénea. Nesta primeira abordagem, o *Tween*® 20 revelou-se um bom agente emulsionante para as proporções utilizadas relativamente ao OE e às diluições efectuadas.

De modo a prever o efeito dos excipientes *Tween*® 20 e etanol na mortalidade das larvas antes de os aplicar nos ensaios finais, realizou-se um pequeno ensaio preliminar para despistar, de forma muito simples, a respectiva toxicidade destes. Após 24h, o efeito tóxico do *Tween*® 20 foi bem superior ao do etanol na medida em que o grupo controlo e o grupo com etanol (1% v/v) não registaram mortalidades. Pelo contrário, o ensaio realizado com *Tween*® 20, a uma concentração menor (0,3% v/v), resultou na morte da totalidade das larvas. Embora fosse comprovado o efeito nefasto do *Tween*® 20 na concentração testada, subsistiu, porém, a dúvida quanto à escolha do agente emulsionante.

O cruzamento dos resultados dos testes de solubilidade e toxicidade indicou-nos que o polisorbato poderia propiciar uma melhor dispersão do OE do que o etanol, funcionando como óptimo surfactante. No entanto, a toxicidade associada a este para uma concentração três vezes inferior ao etanol comprometia por completo qualquer utilização em bio-ensaios. De facto, qualquer valor de mortalidade igual ou superior a 20% invalida um ensaio por completo (World Health Organization 1968). Todavia, relembra-se que uma mortalidade superior entre 5% a 20% (excluído) nos controlos é aceitável, requerendo, no entanto, uma correcção de todas as mortalidades registadas num ensaio por aplicação da fórmula de Abbott (1925) (referida da metodologia secção 2.3.2.3).

Perante a constatação do efeito nefasto do *Tween*® 20 nas larvas e os critérios de validação a aplicar nos resultados, ponderou-se uma avaliação mais aprofundada da toxicidade deste agente para concentrações muito menores, nunca descurando o critério da boa solubilidade do OE. Um ensaio de 24h realizado com *Tween*® 20 a 0,01% e 0,005% (v/v), revelou uma redução drástica da mortalidade (8% de mortalidade relativamente ao controlo com água), um valor já bastante aceitável para ser introduzido nos ensaios padronizados e nas tinas controlos. Contudo, esta redução da concentração do *Tween*® 20 deixou dúvidas quando à garantia do seu potencial emulsionante nos OE. Para avaliar essa questão, efectuou-se uma mistura do OE de alfazema com o emulsionante numa relação volumétrica de 4:1, de modo a preparar uma emulsão a 200 ppm de OE em água e observar a dispersão deste. Verificou-se assim que a capacidade emulsionante deste polisorbato se mantinha a concentrações baixas, deste modo compatíveis com a vida das larvas. Também se obteve a indicação de algum efeito larvívoro do OE de flores de alfazema (mortalidade corrigida de 13%) quando usado a uma concentração de 200 ppm.

A escolha de um agente emulsionante que criasse boas emulsões do OE em água remeteu então para o *Tween*® 20 que deu provas de grande poder emulsionante a baixíssimas concentrações. Posteriormente, nos ensaios larvívoros, o reduzido efeito do *Tween*® a 0,005% na mortalidade das larvas foi ainda atenuado com uma ligeira diminuição da concentração final para 0,004% (v/v).

3.3.1.2. Ensaios prévios e definição das concentrações dos OEs a aplicar nos bio-ensaios

A realização de um ensaio preliminar, numa gama de concentrações de OEs com intervalos espaçados, permitiu estabelecer o conjunto de concentrações de OEs a testar numa gama mais estreita. Para esses ensaios preliminares só foram incluídos os OEs de infrutescências e partes vegetativas de funcho assim como o OE de flores de alfazema como referido na metodologia. Nesta fase, não foram aplicadas réplicas mas sim um conjunto maior de concentrações (cinco diluições mais o grupo controlo). Os resultados da mortalidade das larvas observados no final das 24h de exposição aos OEs encontram-se ilustrados nos gráficos da figura 31.

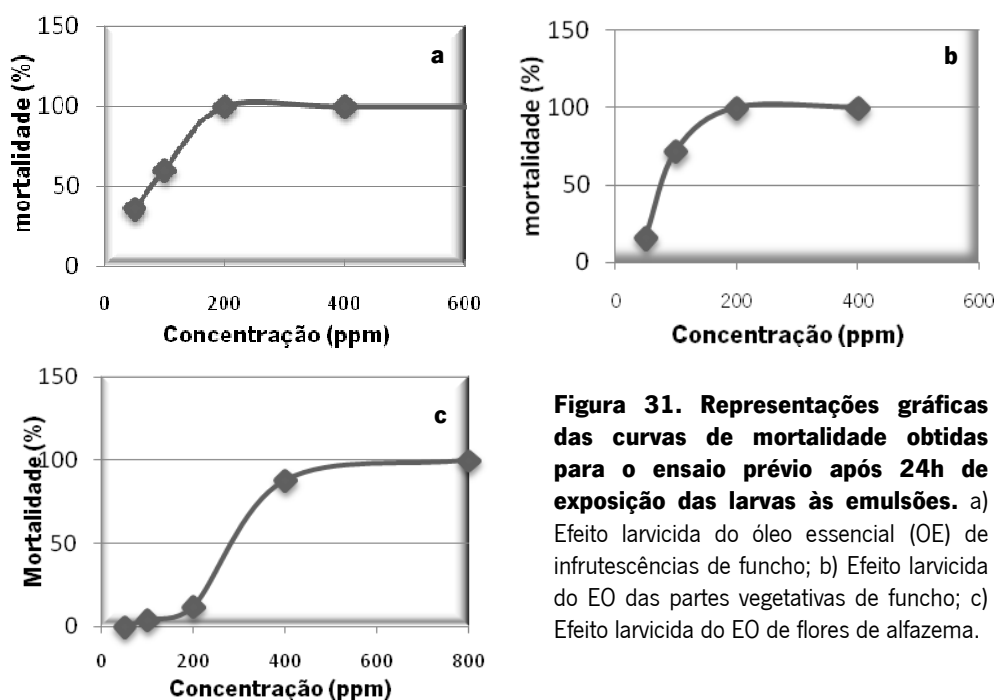


Figura 31. Representações gráficas das curvas de mortalidade obtidas para o ensaio prévio após 24h de exposição das larvas às emulsões. a) Efeito larvídica do óleo essencial (OE) de infrutescências de funcho; b) Efeito larvídica do EO das partes vegetativas de funcho; c) Efeito larvídica do EO de flores de alfazema.

A análise destes dados preliminares permitiu-nos uma pré-avaliação quanto ao potencial larvídica dos três OEs testados e discernir uma gama de concentrações adequadas a aplicar. Como pode ser constatado, os resultados de mortalidade obtidos para os OEs de funcho (figura 31, a) e b) foram muito distintos do registado para o OE de alfazema. O OE desta última (figura 31, c)) só revelou o seu efeito para concentrações entre os 200 e os 800 ppm, um intervalo de concentrações demasiado grande e com um limite máximo muito elevado o que já denuncia uma fraca capacidade larvídica. Pelo contrário, ambos os OEs provenientes de partes distintas do funcho demonstraram a sua

máxima actividade a concentrações bem menores que as do OE de alfazema (abaixo de 200 ppm). Com base nestes dados, decidiu-se que para ambos os ensaios com OEs de funcho seriam aplicadas concentrações de 50, 75, 100 e 150 ppm enquanto que o OE de alfazema seria aplicado nas concentrações de 250, 300, 350 e 400 ppm.

Estes ensaios prévios permitiram igualmente constatar alguns aspectos interessantes do comportamento das larvas sujeitas ao OEs. Ao longo do ensaio, constatou-se que a resposta das larvas não era muito evidente o que dificultou, de certo modo, a distinção entre indivíduos vivos e mortos (Figura 32). De facto o efeito tóxico fez-se notar nas primeiras horas manifestando-se num estado de latência ou paralisia das larvas que frequentemente se dirigiam para o fundo enquanto as mais saudáveis ainda continuavam à superfície. Contudo, as larvas depositadas no fundo não foram todas consideradas moribundas ou mortas. Para tal, foi necessário proceder à agitação do meio com uma pipeta de *Pasteur* e observar a reacção destas. Segundo alguns autores, as larvas moribundas perdem geralmente a capacidade de voltar à superfície, não demonstrando reflexos ou reacção quando a água é perturbada. Seguindo este critério, também referido nos guias de ensaios laboratoriais da OMS, somente as larvas que não tiveram reacção ou permaneceram quase imóveis é que foram efectivamente registadas como mortas. Estes comportamentos das larvas podem ser interpretados à luz de alguns conhecimentos existentes sobre a fisiologia destes insectos e os efeitos neurotóxicos associados a alguns pesticidas comuns. Segundo Haynes (1988), uma observação detalhada dos sintomas comportamentais de insectos intoxicados pode contribuir para a elucidação dos modos de acção de novos insecticidas ou dos mais convencionais.



Figura 32. Fotografias da observação ao estéreomicroscópio de larvas do terceiro estadio do mosquito *Anopheles atroparvus* antes e depois da exposição às emulsões de óleos essenciais. À esquerda: Larva viva não sujeita a ensaios. À direita: Larva morta em consequência do efeito do OE de funcho nos ensaios de exposição. É de notar nas larvas mortas um recolhimento da cabeça e escurecimento da zona do tórax.

3.3.2. Efeito larvícida dos OEs

A metodologia adotada nos ensaios definitivos não diferiu muito da metodologia adotada nos pré-ensaios, à exceção da introdução de réplicas para cada diluição e repetição dos ensaios no caso de alguns OEs. Procurou-se, no entanto, avaliar cada tipo de OE, individualmente e em dias distintos para prevenir a mistura de voláteis na fase gasosa, as influências entre ensaios e consequentemente a afectação dos resultados. Segundo indicações da OMS, é imprescindível confirmar a reprodutibilidade de resultados nesta primeira fase laboratorial de avaliação de insecticidas levando a cabo três ou mais ensaios em dias diferentes mas nas mesmas condições.

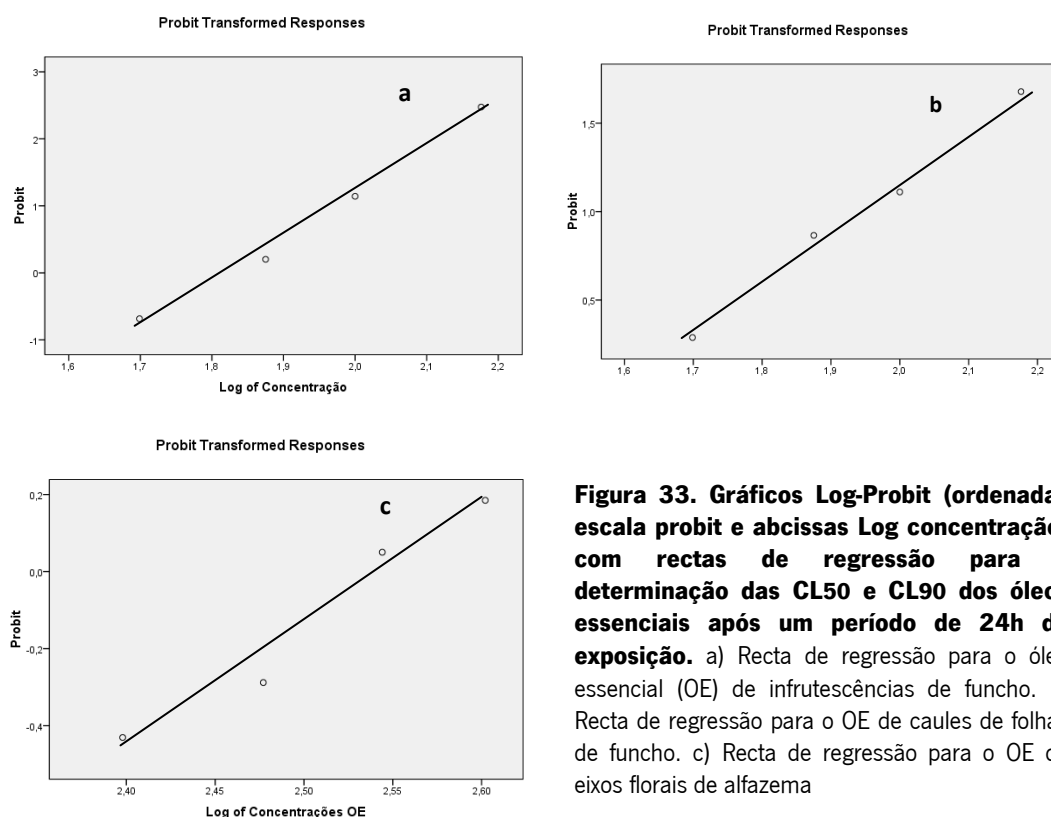


Figura 33. Gráficos Log-Probit (ordenadas escala probit e abcissas Log concentração) com rectas de regressão para a determinação das CL50 e CL90 dos óleos essenciais após um período de 24h de exposição. a) Recta de regressão para o óleo essencial (OE) de infrutescências de funcho. b) Recta de regressão para o OE de caules de folhas de funcho. c) Recta de regressão para o OE de eixos florais de alfazema

Os resultados da análise estatística para a avaliação do efeito larvícida destes três OEs, encontram-se apresentados nos gráficos de regressão Log-Probit da figura 33. De seguida apresentamos na tabela 18 os valores das concentrações letais definidas pela recta de regressão, assim como os valores de χ^2 (Qui-quadrado) que permitem apreciar a qualidade do ajustamento das respectivas rectas (World Health Organization, 1968). Os valores de χ^2 foram comparados com o valor crítico de χ^2 que neste

caso era igual a 5,991 para um nível de significância de 5%, tendo em conta o n° de graus de liberdade (correspondente ao n° de concentrações - 2). Todas as regressões foram consideradas ajustadas tendo em conta que os valores de χ^2 eram inferiores ao valor crítico. Os resultados das concentrações letais para os três OEs revelam de imediato uma diferença considerável de actividade larvicida entre os OEs de funcho e o de flores de alfazema. Para este último, embora os valores de χ^2 fossem aceitáveis, o mesmo não se pode dizer para os valores de actividades letais mínimos e máximos estimados para um intervalo de confiança a 95%. A reduzida actividade larvicida do OE de alfazema determinada no decorrer deste primeiro ensaio desencorajam-nos de imediato para a realização de réplicas de ensaios para este óleo.

Tabela 18. Avaliação da actividade larvicida dos OEs de *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* e *Lavandula angustifolia* no terceiro estágio larvar do mosquito *Anopheles atroparvus* após 24h e 48h de exposição.

Actividade larvicida dos OEs (Intervalo de confiança a 95%)						
Planta Tipologia material	24h			48h		
	CL50 (ppm)	CL90 (ppm)	χ^2	CL50 (ppm)	CL90 (ppm)	χ^2
Funcho Umbelas com frutos	66,4 (63 -70)	106,8 (100-116)	2,71	57,0 (53-60)	96,4 (90-105)	0,62
Funcho Caules e folhas	49,5 (42 -56)	129,2 (111-155)	1,92	39,1 (30-46)	110,0 (98 -131)	0,45
Alfazema Eixos florais	349,2 (315-424)	875,9 (598 - 3811)	0,43	187,1 (26 -241)	596,0 (442-6421)	0,94

CL 50 e CL90 – Concentrações letais para as quais se verifica 50% e 90% de mortalidade. **ppm** – partes por milhão (volume OE/volume água). **χ^2** Valor de Qui-quadrado para avaliar o ajustamento das rectas. Nota: Os valores das concentrações letais encontram-se em ppm (equivalente a µl/l). Entre parêntesis encontram-se os valores mínimos e máximos de actividades letais estimados para um intervalo de confiança a 95%

Para esta espécie em particular (*L. angustifolia*), não foram encontradas publicações acerca da actividade do OE desta planta contra larvas de mosquito. Contudo, numa tentativa, de relacionar os resultados com o conteúdo em compostos maioritário presentes no OE das flores, encontrou-se informação relevante acerca da actividade larvicida do linalool. Este último foi caracterizado pela sua baixa actividade contra *Culex pipiens molestus* (CL50=193 e CL90=213 mg/l) e *Ochlerotatus caspius*

(CL50=156 e CL90=237 mg/l) (Traboulsi *et al.*, 2002; Knio *et al.*, 2008). O OE de flores de *Lavandula stoechas* foi testado contra as larvas de *Culex pipiens molestus* (CL50= 89 mg/l para 24h) (Traboulsi *et al.*, 2002). Porém, o OE das flores desta espécie apresenta um perfil fitoquímico muito diferente do de *L. angustifolia*, tendo sido caracterizado pelos autores como rico em fenchona (40%) e 1,8-cineole (12%), composto este que não mostrou muita toxicidade quando aplicado nas larvas (191 mg/l).

Os resultados obtidos para os OEs de funcho foram considerados satisfatórios conforme as nossas expectativas. Às 24h os OEs de infrutescências e partes vegetativas apresentaram CL50 de 60 e 48 mg/l e CL90 de 103 e 124 mg/l, respectivamente. Apresenta-se aqui no texto da discussão os valores de CL convertidos em mg/l em vez de ppm, ao contrário do que está na tabela 18, unicamente para facilitar as comparações com valores referidos noutros trabalhos, embora os diversos autores apresentem normalmente numa das duas unidades. Ao analisar as concentrações letais, verifica-se que o óleo extraído das partes vegetativas exibiu uma CL50 menor às 24 e 48h, revelando-se mais eficaz para matar 50% das larvas. Por seu lado, o OE de infrutescências de funcho causou 90% de morte para uma CL90 inferior relativamente ao OE de partes vegetativas. Este facto é difícil de fundamentar pois ainda se sabe muito pouco sobre os modos de acção de misturas tão complexas como os OEs e os vários alvos moleculares específicos dos insectos. No entanto, a falta de repetição dos ensaios é um aspecto relevante que nos leva ponderar os resultados com precaução. Esta maior eficácia do óleo das partes vegetativas encontra-se também evidenciada numa análise da mortalidade das larvas ao longo do tempo (figura 35). Uma comparação do efeito destes dois OEs, para uma concentração de 75 ppm, permite verificar que o OE de caules e folhas teve uma actuação mais rápida sobre as larvas especialmente numa fase inicial até as 18h. Esta diferença de actividade nas larvas é um pouco surpreendente pois o OE das partes vegetativas revelou, relativamente ao OE de infrutescências, menores teores de *trans*-anetole (com actividade larvicida reconhecida) e fenchona (pelo menos identificado como repelente). No entanto, esta actividade larvicida mais acentuada para causar a morte de 50% das larvas poderá ser atribuída à existência de um teor superior em α -felandreno (12%) e ligeiramente maior em estragole (57%) no OE das partes vegetativas. De modo a elucidar esta questão seria vantagoso repetir os ensaios larvicidas com os OEs assim como dos seus constituintes principais.

O efeito larvicida do OE de frutos de funcho já foi reportado para a variedade *dulce* em ensaios contra o *Aedes aegypti*. (Chantraine *et al.*, 1998). Nesse estudo, a actividade larvicida do óleo de frutos revelou-se bem superior (CL50 =24 mg/l e CL95 =30 mg/l). O forte conteúdo em E-anetole (66%) foi

indicado como a principal razão para esta actividade já que a avaliação do composto puro resultou numa CL50 igual a 15 mg/l. Embora os resultados obtidos no nosso trabalho sejam bastante distintos para a mesma espécie de planta, apela-se a atenção para o facto dos OEs apresentarem um teor muito reduzido em *trans*-anetole e o mosquito alvo, no nosso caso, pertencer a um género que já deu indicações de uma menor sensibilidade a uma série de OEs (incluindo o aneto) relativamente a outras espécies dos géneros *Aedes* sp. ou *Culex* sp. (Amer e Mehlhorn, 2006). Em contrapartida, os resultados que obtivemos fornecem evidências de que outros compostos presentes nos OEs estudados (estragole, fenchona, pinenos e/ou felandrenos) poderão exibir actividade semelhante à do E-anetole. Os valores de concentrações letais determinados neste trabalho podem ser directamente comparados com os valores divulgados por outros autores em ensaios larvicidas realizados com a mesma colónia de mosquito (Rocha *et al.*, 2006). Assim, os EOs de *Juniperus communis* e *Mentha pulegium* foram igualmente identificados pelo seu potencial tóxico contra as larvas de *An. atroparvus*, exibindo concentrações letais semelhantes às que foram determinadas para os OEs de funcho amargo (LC50 de 35 e 58 µl/ml e CL90 de 83 e 109 µl/ml, respectivamente) (Rocha *et al.*, 2006).

Por fim refere-se que os ensaios realizados com salsa não puderam ser desenvolvidos conforme as nossas expectativas. Não foi realizado um único ensaio para avaliar o efeito do OE de folhas de *Petroselinum crispum* spp. *neapolitanum* e somente um ensaio com o OE das infrutescências. Relativamente a este último, a não realização de um ensaio prévio, pelo motivo abordado acima, acabou por ter consequências na qualidade dos resultados obtidos. Todas as concentrações do OE de infrutescências de salsa provocaram uma mortalidade total ao fim de 24h (97% para a menor concentração usada a 50 ppm), impedindo uma determinação dos parâmetros de morte (CL50 e CL90). Apesar de não se ter conseguido uma gama de actividade passível de ser avaliada por parâmetros concretos, fica a indicação que o OE de frutos desta espécie poderá possuir um potencial larvicida mais elevado que os OEs de funcho. Por outro lado, é de referir que neste ensaio observou-se uma resposta de morte das larvas curiosamente distinta do que fora constatado visualmente para os ensaios do OEs de funcho (figura 32). Neste caso, as larvas moribundas não apresentaram o mesmo comportamento de migração para o fundo das tinas mas ficaram à superfície da solução em agregados (figura 34, b). A observação das larvas efectuada ao longo do tempo não indicava, à partida, qualquer efeito imediato de toxicidade. No entanto, no momento das contagens, às 3h e 18h, quando se provocou uma perturbação do líquido as larvas agregadas não efectuaram qualquer movimento e foram caindo para o fundo da tina de uma forma totalmente inerte (figura 34,

c)) ao passo que as poucas que restavam vivas ainda se conseguiam movimentar mas com muitas dificuldades (figura 34, a). A análise destes comportamentos sugere-nos que as diferenças registadas nos sintomas de intoxicação poderão estar relacionados com modos ou velocidade de actuação distintos dos OEs e seus constituintes. Porém, no conjunto da literatura consultada não foram encontradas descrições ou referências quanto ao comportamento das larvas nos ensaios larvicidas, impossibilitando qualquer comparação com outros trabalhos. O OE de frutos de salsa apresenta de facto uma composição muito diferente da dos OEs de funcho. A presença de um fenilpropanoide muito pouco comum, o 1-Alil-2,3,4,5-tetrametoxibenzeno (34%), estará possivelmente na origem destes resultados. Contudo, a presença de apiole (14%), 1,3,8 *p*-mentatrieno (13%) e pinenos (13 e 12%), leva-nos a crer que poderá existir um efeito sinérgico interessante da mistura final com um provável contributo adicional destes compostos. Esta possibilidade permanece no domínio da especulação já que não foram encontrados estudos a esse respeito que permitam fundamentar esta ideia, no entanto, já foi reconhecida a actividade larvicida do α -pineno ($LC_{50}=47-49$ mg/l) contra *Culex Pipiens molestus* (Traboulsi *et al.*, 2002).

A eficiência do OE das infrutescências de salsa, em termos de período de actuação, foi significativamente superior aos de funcho quando se compararam resultados de mortalidade ao longo do tempo para uma mesma diluição (75 ppm). Este resultado está bem patente no gráfico da figura 35. O OE de frutos de salsa provocou 100% de morte no período que decorreu entre as 3h e as 18h para a concentração de 75 ppm.



Figura 34. Fotografias ilustrando os comportamentos das larvas de *An. atroparvus* observados ao longos dos ensaios larvicidas com óleo essencial de infrutescências de salsa após algum tempo de exposição aos OEs. a) Larvas vivas e saudáveis localizadas à superfície do meio na periferia da tina. b) Larvas moribundas agregadas com larvas mortas à superfície da água antes de esta ser agitada. c) Larvas mortas pousadas no fundo da tina de ensaio.

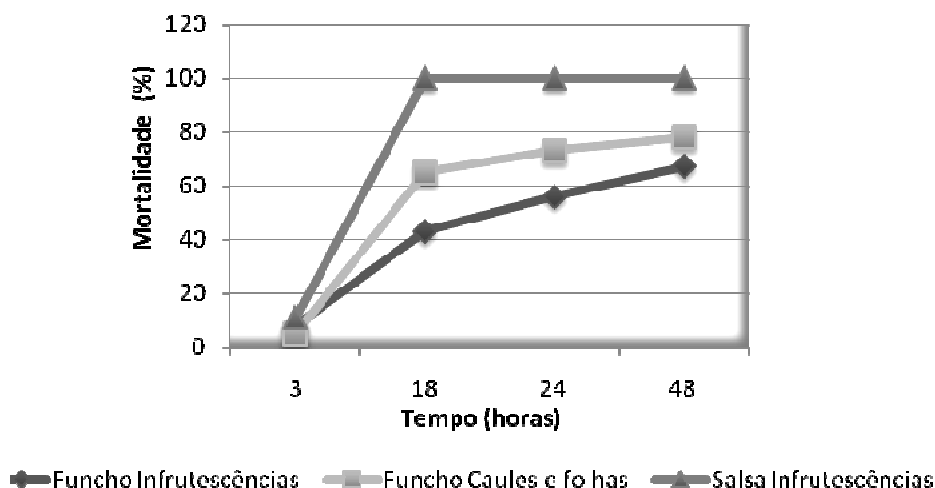


Figura 35. Representação gráfica dos valores de mortalidade média registados para os três óleos essenciais mais activos contra as larvas de *An. atroparvus* ao longo de 48h de ensaio a uma diluição de 75 ppm. Nota: Cada valor é resultado do somatório entre as três réplicas (no caso da salsa) ou 6 réplicas (no caso do funcho) do número de larvas mortas na diluição a 75 ppm e correcção relativamente ao controlo por aplicação da fórmula de Abbot.

Perante estes resultados ainda pouco conclusivos, impõe-se a necessidade de realizar estudos aprofundados com o *Petroselinum crispum* cujas potencialidades foram reveladas neste trabalho. De facto não existem muitas referências de extractos desta planta em ensaios larvicidas. Tanto quanto é do nosso conhecimento, só existe a publicação de um ensaio larvicida em mosquitos. Bio-ensaios larvicidas contra o mosquito *Ochlerotatus caspius*, deram indicações de uma forte actividade de EO de *Thymus vulgaris* (flores), *Petroselinum crispum* (frutos) e uma actividade moderada para *Pimpinella anisum* (frutos) (Knio *et al.*, 2008). O óleo de salsa, caracterizados pelos autores como sendo maioritariamente constituído por timol (50%), *p*-cimeno (29%) e γ -terpinene (15%), exibiu valores de CL50 e CL90 iguais a 34 e 62 $\mu\text{g/l}$, respectivamente, para o ensaio de 24h. Estas concentrações letais foram muito semelhantes às determinadas isoladamente para o composto maioritário, o timol (CL50= 34 $\mu\text{g/l}$ e CL90= 51 $\mu\text{g/l}$) sugerindo que a actividade larvicida do OE não era resultante somente da presença do timol. Porém, os dados divulgados por Knio *et al.* (2008) não foram muito elucidativos para a compreensão do resultado obtido neste trabalho com o OE de fruto de salsa. De facto, não foi possível estabelecer qualquer paralelismo entre os resultados, tal era a divergência fitoquímica entre a nossa amostra de OE, não contendo timol, e a definida pelos autores. Finalmente, prevê-se que o OE de frutos de salsa possa apresentar valores de CL50 e CL90 abaixo de 50 ppm em futuros ensaios contra as larvas do mosquito *Anopheles atroparvus*.

4. Considerações Finais e Perspectivas Futuras

Na generalidade, consideramos que o trabalho desenvolvido atingiu os objectivos inicialmente propostos para esta primeira fase dos trabalhos. A interligação entre as três componentes da investigação possibilitou o estabelecimento de um compromisso entre os diversos interesses surgidos ao longo do trabalho e o objectivo fundamental deste. Como foi sendo referido oportunamente, nem todos as experiências levaram à obtenção de dados conclusivos. Porém, considera-se que a abordagem desenvolvida contribui significativamente para a aquisição de conhecimentos e práticas experimentais essenciais para dar continuidade ao trabalho. Com base nos resultados obtidos, prevê-se que em breve se possa prolongar esta investigação focada para a concepção e produção biotecnológica de fragrâncias, com possível aplicação no controlo de insectos.

Numa análise global do trabalho, constata-se que os trabalhos inerentes a culturas *in vitro* não foram muito mais além do seu estabelecimento, à excepção de *Lavandula angustifolia* em que se procurou otimizar o crescimento de rebentos caulinares por micropropagação. As adversidades encontradas nesta fase dos trabalhos vieram limitar a conclusão do estudo dos OEs em raízes normais e *hairy roots*, mas não se refletiram negativamente na obtenção de plantas *in vitro* e caracterização química dos OEs, o que valorizou o trabalho. O insucesso que se verificou para o procedimento de infecção, levado a cabo com segmentos de *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* (funcho amargo) e *Petroselinum crispum* spp. *neapolitanum* (salsa de folha lisa), compromete-nos à realização de novas tentativas. Apesar disto, o desenvolvimento prolífero do sistema radicular em funcho e salsa não transformados foi particularmente satisfatório e levantou um grande interesse para a manutenção destas estruturas. Relativamente às *hairy roots* de aneto obtidas, depositamos uma grande expectativa para a produção de fenilpropanóides de interesse (apiole, dillapiole e miristicina) recorrendo a esse sistema.

Por outro lado, a caracterização dos OEs das quatro espécies descritas conferiu, na nossa perspectiva, uma elevada consistência ao trabalho permitindo levantar questões de várias naturezas. Todas as espécies estudadas, representam culturas de grande interesse económico, na Europa e no resto do mundo, pela grande aplicação dos seus OEs nas indústrias alimentar e cosmética. Este e outros trabalhos permitem uma valorização destas plantas abrindo novas perspectivas de aplicação ainda não exploradas. O estudo químico dos OEs em conjunto com os ensaios larvicidas conferiram destaque a *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* e *Petroselinum crispum* spp. *neapolitanum* como fontes de potenciais compostos insecticidas. O funcho amargo, a salsa de folha lisa e o aneto adquiriram

especial relevância ao longo do trabalho, em virtude da existência de compostos majoritários relativamente específicos destas espécies (anetole; 1,3,8-*p*-mentatrieno e 1-allil-2,3,4,5-tetrametoxibenzeno; e dill éter, respectivamente). Como foi constatado ao longo da caracterização dos OEs das diversas amostras vegetativas, a variabilidade nos rendimentos e composições é demasiado ampla para ser negligenciada. A definição da composição química dos OEs aplicados em biotestes foi importante para a interpretação e discussão dos resultados. Os dados fitoquímicos reunidos para as espécies em questão irão servir de base para delinear objectivos futuros. A partir das óptimas indicações obtidas acerca do efeito larvicida dos OEs de funcho amargo e salsa de folha lisa, prevê-se uma repetição de ensaios em larvas de mosquitos de modo a reforçar os resultados. Posteriormente, num estudo mais aprofundado, o isolamento de alguns dos constituintes com potencial actividade larvicida e a elaboração de misturas destes deverá constituir um passo inicial para a optimização e possível concepção de formulações recorrendo a métodos e suportes de libertação controlada.

Através deste trabalho e das leituras efectuadas constatou-se que existem diversos aspectos envolvidos nos efeitos insecticida ainda por esclarecer. Alguns destes, obviamente inerentes às diferenças de composição entre os OEs (interacções favoráveis ou desfavoráveis entre vários compostos) e aos mecanismos de acção (cinética e tipo de interacção com o alvo molecular). Ainda há muito por descobrir sobre as actividades fisiológicas dos OEs nos insectos, nomeadamente ao nível da sua interacção com receptores. Actualmente, estão a ser dados os primeiros passos relativamente à caracterização dos receptores já identificados, através de clonagem, da expressão e do estudo funcional (estruturas tridimensionais) das proteínas dos receptores (Bischof and Enam, 2004). Espera-se que no futuro este tipo de dados venha facilitar não só a identificação de análogos mas possibilite também a identificação de potenciais antagonistas que bloqueiem as respostas nervosas/hormonais ao nível dos receptores. O conhecimento aprofundado dos modos de interacção dos químicos com os receptores irá certamente possibilitar o desenvolvimento de uma nova geração de pesticidas mais específicos e de utilização mais bioracional. Segundo Casida e Quistad (1998), o controlo de pestes envolve actualmente três importantes domínios de pesquisa, sendo eles: o controlo de resistências químicas; a descoberta de novos alvos bioquímicos e o desenvolvimento de novas abordagens químicas. É neste último domínio que se pretende desenvolver os próximos trabalhos de investigação.

5. | Referências Bibliográficas

- Abbott W.S. (1925). A method of Computing the Effectiveness of Insecticide. *Journal of Economic Entomology*. **18**: 265– 267.
- Aerts R.J. and A. Mordue J. (1997). Feeding deterrence and toxicity of neem triterpenoids. *Journal of Chemical Ecology*. **23** (9): 2117-2132.
- Angionini A., Barra A., Coroneo V., Dessi S. and Cabras P. (2006). Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 4364-4370.
- Amer A. and Mehlhorn H. (2006). Larvicidal Effects of Various Essential Oils against *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitol. Res.* **99**: 466-472.
- Amer S.A.A and Momen F.M. (2005). Effect of French lavender essential oil on some mites of the family Phytoseiidae (Acari:Phytoseiidae). *Acta Phytopatologica et Entomologica Hungarica*. **40**: 409-415.
- Andrade P.B., Seabra R.M., Valentão P. and Areias F. (1998). Simultaneous determination of flavonoids, phenolic acids, and coumarins in seven medicinal species by HPLC/Diode-array detector. *J. Liq. Chrom. and Related Technologies*. **21**(18): 2813-2820.
- Andrade P.B., Seabra R.M., Valentão P. and Areias F. (2000). HPLC/DAD analysis of phenolic compounds from lavender and its application to quality control. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **23** (16): 2563-2572.
- Andrade L.B., Echeverrigaray S., Fracaro F., Pauletti G.F. and Rota L. (1999). The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **56**: 79–83.
- Appendino G., Jakupovic J. and Bossio E. (1998). Structural Revision of the Parsley Sesquiterpenes Crispanone and Crispane. *Phytochemistry*. **49** (6) p.1719-1722.
- Badoc A., Lamarti A., Bourgeois G., Carde J.-P. and Deffieux G. (1995). Hybridation Intraspécifique chez le Fenouil, *Foeniculum vulgare* mill. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. **134**: 107-126.
- Bailer J., Aichinger T., Hackl G., Hueber K. and Dachler M. (2001). Essential oil Content and Composition in Commercially Available Dill Cultivars in Comparison to Caraway. *Industrial Crops and Products*. **14**: 229–239.
- Banthorpe D.V., Charlwood B.V. and Francis M.J.O. (1972). The Biosynthesis of monoterpenes. *Chemical Reviews*. **72** (2):115-155.
- Banthorpe D.V., Bilyard H.D. and Watson D.G. (1985). Pigment formation by callus of *Lavandula angustifolia*. *Phytochemistry*, **24**: 2677-2680. Referred by: Segura J. and Calvo M.C. (1991). *Lavandula* spp (Lavender): In vitro Culture, regeneration of Plants, and the Formation of Essential Oils and Pigments, in: Bajaj, Y.P.S. (Edts.), *Biotechnology in agriculture and Forestry, vol. 15, Medicinal and aromatic plants III*, Springer- Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 283-310.
- Banthorpe D.V., Branch S.A., Njar V.C.O., Osborne M.G. and Watson D.G. (1986). Ability of plant cultures to synthesize and accumulate lower terpenoids. *Phytochemistry*, **25**: 629-636. Referred by: Segura J. and Calvo M.C. (1991). *Lavandula* spp (Lavender): In vitro Culture, regeneration of Plants, and the Formation of Essential Oils and Pigments, in: Bajaj, Y.P.S. (Edts), *Biotechnology in agriculture and Forestry, vol. 15, Medicinal and aromatic plants III*, Springer- Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 283-310.

- Banthorpe D.V., Bates M.J. and Ireland M.J. (1995). Stimulation of Accumulation of Terpenoids by Cell suspensions of *Lavandula angustifolia* following Pre-treatment of Parent Callus. *Phytochemistry*. **40**(1) : 83-87.
- Barazani O., Cohen Y., Fait A., Diminshtein S., Dudai N., Ravid U., Putievky E. and Friedman J. (2002). Chemotypic differentiation in indigenous populations of *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* in Israel. *Biochemical Systematics and Ecology*. **30**: 721-731.
- Barbosa R.A., Lopes V.R. e Poças I. (2007). Funcho (*Foeniculum vulgar* Mill.)- Caracterização morfológica de populações silvestres do Entre Douro e Minho. Actas do II Colóquio Nacional de Plantas Aromáticas e Medicinais, Associação Portuguesa de Horticultura (Eds.), Caldas dos Gerês, Portugal. pp. 59-67.
- Bertani G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**:293-300.
- Bischof L.J., Enan E.E. (2004). Cloning, expression and functional analysis of an octopamine receptor from *Periplaneta Americana*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **34**: 511–521.
- Bond J.G., Marina C.F. and Williams T.(2004). The naturally derived insecticide spinosad is highly toxic to *Aedes* and *Anopheles* mosquito larvae. *Medical and Veterinary Entomology*. **18**: 50–56.
- Bramley P.M. (1995). Isoprenoid Metabolism. In: Dey, P.M. and Harborn, J.B. (Edts.), *Plant Biochemistry*, Academic Press, London. pp. 417-437.
- Brillianceau M.H. (1986). Culture in vitro de racines transformées para *Agrobacterium rhizogenes*, pt 2, Thesis, Paris Sud Université, France, 227p. Referred by: Hunault H., Desmarest P., Du Manoir J. (1989). *Foeniculum vulgare* Miller: Cell Culture, Regeneration, and the Production of Anethole. In: Bajaj YPS (edts.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry 7, Medicinal and Aromatic Plants II*, Berlin Heidelberg, Springer, pp.185-212.
- Cambournac F.J.C. (1942). Sobre a epidemiologia do sezonismo em Portugal. Sociedade Industrial de Tipografia, Lisboa. Citado por: Jetten T.H. and Takken W. (Edts.) (1994). Anophelism without malaria in Europe, A review of the ecology and distribution of the genus *Anopheles* in Europe. Wageningen Agricultural University Papers. 94-5, 69 p.
- Cambournac F.J.C. (1994). Contribution to the history of malaria epidemiology and control in Portugal and some other places. *Parassitologia*. **36**:215-222.
- Capinha C., Gomes E., Reis E., Rocha J., Sousa C.A., do Rosário V. E., Almeida A. P. (2009). Present habitat suitability for *Anopheles atroparvus* (Diptera, Culicidae) and its coincidence with former malaria areas in mainland Portugal. *Geospatial Health*. **3**(2): 177-187.
- Cavaleiro, C.M.F., Roque, O.L. e da Cunha, A.P. (1993). Contribution for the characterization of Portuguese fennel chemotypes. *J. Essent. Oil Res.* **5**: 223–225.
- Casida J.E. and Quistad G.B. (1998). Golden Age of Insecticide Research: Past, Present, or Future? *Annu. Rev. Entomol.* **43**:1–16.
- Chantraine J.M., Laurent D., Ballivian C., Saavedra G., Ibanez R. and Vilaseca L.A. (1998). Insecticidal Activity of Essential Oils on *Aedes aegypti* Larvae. *Phytotherapy research*. **12**:350-354.

- Charlwood B.V. and Bantorpe D.V. (1991). Terpenoids, in: Harborn, J.B. and Dey, P.M. (Edts.), *Methods in Plant biochemistry*, vol. 7, by Academic Press, London.
- Chatzopoulou P.S. and Goliaris A.H. (2003). Contribution to the analysis of the Volatiles Constituents from some Lavender and Lavandin Cultivars grown in Greece. *Scientia Pharmaceutica*. **71**, 229-234.
- Chemat F., Lucchesi M.E., Smadja J., Favretto L., Colnaghi G. and Visinoni F. (2006). Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. *Analytica Chimica Acta*. **555**:157-160.
- Cheng S.S., Chang H.-T., Chang S.-T., Tsai K.-H., Chen W.-J. (2003). Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource Technology*. **89**: 99–102.
- Croteau R. (1987). Biosynthesis and catabolism of Monoterpenoids. *Chemical Reviews*. **87** (5): 926-954.
- da Cunha A.P., Perreira da Silva A., Roque O.R. e Cunha E. (2004). *Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia*. Serviços de Educação e Bolsa, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, p.56.
- da Cunha A.P., Ribeiro J.A. e Roque O.R. (2007). *Plantas Aromáticas em Portugal Caracterização e utilizações*. Ed Serviços de Educação e Bolsas. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa. 328p.
- Dhadialla T.S., Carlson G.R., and Le D.P. (1998). New insecticides with ecdysteroidal and juvenile Hormone activity. *Annu. Rev. Entomol.* **43**:545–69.
- Dharmagadda V.S.S., Naik S.N., Mittal P.K. and Vasudevan P. (2005). Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. *Bioresource Technology*. **96**: 1235–1240.
- Díaz-Maroto M.C., Pérez-Coello M.S. and Cabezudo M.D. (2002). Effect of Different Drying Methods on the Volatile Components of Parsley (*Petroselinum crispum* L.) *Eur. Food Res. Technol.* **215**: 227–230.
- Dob T., Dahmane D., Tayeb B. and Chelghoum C. (2005). Chemical composition of the essential oil of *Lavandula dentata* L. from Algeria. *The International Journal of Aromatherapy*. **15**:110–114.
- Dronne S., Colson M., Moja S. and Faure O. (1998). Plant regeneration and transient GUS expression in a range of lavandin (*Lavandula* × *intermedia* Emeric ex Loiseleur) cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* **55**: 193–198.
- Dronne S., Moja S., Jullien F., Berger F. and Caissard J.-C. (1999). Agrobacterium - mediated transformation of lavandin (*Lavandula* × *intermedia* Emeric ex Loiseleur). *Transgenic Res.* **8**: 335–347.
- Eisenreich W., Rohdich F. and Bacher A. (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science*, **6** (2): 78-84.
- Enan E. (2001). Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. Comparative Biochemistry and Physiology Part C. **130**: 325-337.
- Evans P.D. (1984). A modulatory octopaminergic neurone increases cyclic nucleotide levels in locust skeletal muscle. *J. Physiol. Lond.* **348**:307–324.

- Evans P.D. and Robb S.(1993). Octopamine Receptor Subtypes and Their Modes of Action *Neurochemical Research*. 18 (8): 869–874.
- Everitt Z.M. and Lockwood G.B.(1995). *Anethum graveolens* L. (Dill). *In vitro* culture and metabolism of volatile constituents, in: Bajaj Y.P.S. (edt.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 33, *Medicinal and Aromatic Plants III*. Berlin: Springer-Verlag. pp. 21–34.0430
- Fakhari A.R., Salehi P., Heydari R. Ebrahimi S. N. and Haddad P.R. (2005) Hydrodistillation-headspace solvent microextraction, a new method for analysis of the essential oil components of *Lavandula angustifolia* Mill. *J Chromatogr A*. **1098**:14–18.
- Fernandes L.P., Oliveira W.P., Sztatisz J. and Novák C. (2008). Thermal properties and release of *Lippia sidoides* essential oil from gum arabic/maltodextrin microparticles. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. **94** (2): 461–467.
- Gabrieli C. and Kokkalou E. (2003). A new acetylated glucoside of luteolin and two flavone glucosides from *Lavandula stoechas* ssp. *Stoechas*. *Pharm.*. **58** (6): 426-427.
- Gan-Mor S.and Matthews G.A. (2003). Recent Developments in Sprayers for Application of Biopesticides: an Overview. *Biosystems Engineering*. **84** (2), 119–125.
- Georgiev M, Pavlov A, Ilieva M. (2004). Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspension: the effect of temperature. *Biotechnol. Lett.*. **26** (10): 855–856.
- Gross M., Friedman J., Dudai N., Larkov O., Cohen Y., Bar E., Ravid U., Putievsky E. and Lewinsohn E. (2002). Biosynthesis of estragole and *tanethole* in bitter fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *vulgare*) chemotypes. Changes in SAM:phenylpropene O-methyltransferase activities during development. *Plant Science*. **163**: 1047-1053.
- Hajhashemi V., Ghannadi A. and Sharif B. (2003). Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *J Ethnopharmacol.*. **89**: 67–71.
- Harbach R.E. (2004). The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bulletin of Entomological Research*. **94**: 537-553.
- Harbach R.E. (2007). The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny, in: Zhang Z.-Q. and Shear W.A. (Edts), *Linnaeus Tercentenary: Progress in Invertebrate Taxonomy. Zootaxa*, **1668**: 766 p.
- Haynes K. F. (1988). Sublethal Effects of Neurotoxic Insecticides Insect Behavior. *Ann. Rev. Entomol.*. **33**:149-168.
- Hemingway J., Davidson G. (1983). Resistance to organophosphate and carbamate insecticides in *Anopheles atroparvus*. *Parasitologia*. Apr. 25(1):1-8.
- Hori M. (2003). Repellency of essential oils against the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* (Fabricius) (Coleoptera:Anobiidae). *Appl. Entomol. Zool.*. **38** (4): 467-473.
- Hunault H., Desmarest P., Du Manoir J. (1989). *Foeniculum vulgare* Miller: Cell Culture, Regeneration, and the Production of Anethole, in: Bajaj Y.P.S. (edt.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry 7, Medicinal and Aromatic Plants II*, Berlin Heidelberg, Springer, pp. 185-212.

- Hunault H., Du Manoir J. (1992). Micropropagation of Fennel (*Foeniculum vulgare* Miller), in: Bajaj Y.P.S. (edt.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry 19, High-Tech and Micropropagation III*, Berlin Heidelberg, Springer, pp. 199-218.
- Huopalahti R. and Linko R.R. (1983). Composition and Content of Aroma Compounds in Dill, *Anethum graveolens* L., at Three Different Growth Stages. *J. Agric. Food Chem.* **31**: 331- 333.
- Huopalahti R and Kesälahti E.(1985). Effect of drying and freeze-drying on the aroma of Dill-*Anethum graveolens* cv Mammot. In: A B. Svendsen and J.J.C. Scheffer (eds.), *Essential oils and aromatic plants*. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, the Netherlands. pp.179-185.
- Ilieva M., Pavlov A. (1997). Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell-suspension culture *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 683-688.
- Iriti M., Colnaghi G., Chemat F., Smadja J., Faoro F. and Visinoni F.A. (2006). Histo-cytochemistry and scanning electron microscopy of lavender glandular trichomes following conventional and microwave-assisted hydrodistillation of essential oils: a comparative study *Flavour Fragr. J.* **21**: 704–712.
- Isman M.B. (2006). Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents in Modern Agriculture and an increasingly regulated world. *Anu. Rev. Entomol.* **51**:45–66.
- Isman M.B. and Akhtar Y. (2007). Plant Natural Products as a Source for Developing Environmentally Acceptable Insecticides, in: Ishaaya I., Nauen R. and Horowitz A.R. *Insecticides Design Using Advanced Technologies*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 235-248.
- Jaenson T.G.T., Garboui S., Pålsson K. (2006) Repellency of Oils of Lemon Eucalyptus, Geranium, and Lavender and the Mosquito Repellent MyggA Natural to *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in the Laboratory and Field. *J. Med. Entomol.* **43** (4): 731–736.
- Jetten T.H. and Takken W. (1994). Anophelism without malaria in Europe, A review of the ecology and distribution of the genus *Anopheles* in Europe. Wageningen Agricultural University Papers. 94.5. 69p.
- Khambay B.P.S. (2002). Pyrethroid Insecticides. *Pesticide Outlook*. April, 49-54.
- Khambay B.P.S, Batty D., Beddie D.G., Denholm I. and Cahill M. R. (1997). A New Group of Plant-Derived Naphthoquinone Pesticides. *Pestic. Sci.* **50**: 291-296.
- Kim D.-H. and Ahn Y.-J. (2001). Contact and fumigante activities of constituents of *Foeniculum vulgare* fruit against three coleopteran stored-product insects. *Pest. Manag. Sci.* **57**: 301-306.
- Kim D.-H., Kim S.-I., Chang K.-S. and Ahn Y.-J. (2002). Repellent activity of constituents Identified in *Foeniculum vulgare* Fruit against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Agric. Food Chem.* **50**: 6993-6996.
- Kim N.S. and Lee D.S. (2002) Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **982**: 31–47.
- Koedam, A. (1987). Some aspects of Essential Oil preparation, in, Sandra, P. and Bicchi, C. (Edts.), *Capillary Gas Chromatography in Essencial Oil Analysis.*, Huethig, Heidelberg; Basel; New York. pp.13-27.

- Knio K.M., Usta J., Dagher S., Zournajian H. and Kreydiyyeh S.(2008). Larvicidal activity of essential oils extracted from commonly used herbs in Lebanon against the seaside mosquito, *Ochlerotatus caspius*. *Bioresource Technology*. **99**:763–768.
- Kostyukovsky M., Rafaeli A., Gileadi C., Demchenko N. and Shaaya E. (2002). Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest. Manag. Sci*. **58**:1101–1106.
- Kubo I. (1991). Screening Techniques for Plant-Insect Interactions, in: K. Hostettmann (Edt.), *Assays for Bioactivity*. pp. 179-193.
- Kurkin V. A. (2003). Phenylpropanoids from medicinal plants: Distribution, classification, structural Analysis, and biological activity. *Chemistry of natural compounds*. **39** (2): 123-153.
- Kurowska A. and Gałazka I. (2006). Essential Oil Composition of the Parsley Seed of Cultivars Marketed in Poland. *Flavour Fragr. J*. **21**: 143–147.
- Lamarti A., Badoc A., and Carde J.-P. (1993a). Étude chromatographique de l'huile essentielle de la plantule de fenouil amer (*Foeniculum vulgare* Mill.) Caractéristiques spectrales (UV, IR, SM) de ses constituants. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. **132**: 73-89.
- Lamarti A., Badoc A., Deffieux G. and Carde J.-P. (1993b). Étude des Arylpropènes extraits de l'Huile Essentielle des Fruits de Persil *Petroselinum crispum* (MILL.) A. W. HILL, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. **132**: 90- 98.
- Landmann C., Fink B., Festner M., Dregus M., Engel K.-H. and Schwab W. (2007). Cloning and functional characterization of three terpene synthases from lavender (*Lavandula angustifolia*).*Arch. Biochem. and Biophys*. **462** (2): 417-429.
- Lappin G.J., Stride J.D. and Tampion J. (1987). Biotransformation of monoterpenoids by suspension cultures of *Lavandula angustifolia*. *Phytochemistry*. **26**: 995-997. Referred by: Segura J. and Calvo M.C. (1991). *Lavandula* spp (Lavender): In vitro Culture, regeneratin of Plants, and the Formation of Essencial Oils and Pigments, in: Bajaj, Y.P.S (Edt.), *Biotechnology in agriculture and Forestry, vol. 15, Medicinal and aromatic plants III*, Springer- Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 283-310.
- Lichtenstein E.P.,Liang T.T.,Schulz K.R., Schnoes H.K. and Carter G.T.(1974). Insecticidal and Synergistic Components Isolated from Dill Plants. *J. Agr. Food Chem..* **22**(4): 658-664.
- Lichtenthaler H.K. (1997). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate independent pathway. *FEBS Letters*. **400**: 271–274.
- Lis-Balchin M.(2002). *Lavandula* Essential Oils. Standardization, ISO; Adulteration and its detection using GC; enantiomeric columns and bioactivity, in: Lis-Balchin (Edt.) *Lavender: The Genus Lavandula*, Taylor & Francis, New York. pp.117-123.
- López M.G., Sánchez-Mendoza I.R., and Ochoa-Alejo N. (1999). Compative Study of Volatile Components and Fatty Acids of Plants and in Vitro Cultures of Parsley (*Petroselinum crispum* (Mill) Nym ex Hill). *J. Agric. Food Chem..* **47**: 3292- 3296.

- Macêdo M. E., Consoli R.A.G.B., Grandi T.S.M., Anjos A.M.G., Oliveira A. B., Mendes N. M., Queiróz R.O., Zani C.L. (1997). Screening of Asteraceae (Compositae) Plant Extracts for Larvicidal Activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. **92** (4): 565-570.
- Masanetz C. and Grosch W. (1998). Key Odorants of Parsley Leaves (*Petroselinum crispum* [Mill.] Nym. ssp. *crispum*) by Odour-Activity Values. *Flavour Fragr. J.* **13**: 115-124.
- Masuda K., Koda Y. and Okazawa Y. (1977). Callus formation and embryogenesis of endosperm tissues of parsley seed cultured on hormone-free medium. *Physiol. Plant.* **41**:135-138. Referred by: Vandemoortele J.E, Billard J., Boucaud Gaspar Th. (1996). Micropropagation of parsley through axillary shoot proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* **44**: 25-30.
- Mello M.O. and Silva-Filho M. (2002). Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Braz. J. Plant Physiol.* **14**(2):71-81.
- Miraldi E. (1999). Comparison of the Essential Oils from ten *Foeniculum vulgare* Miller samples of Fruits of Different Origin. *Flavour Fragr. J.* **14**: 379-382.
- Moretti M.D.L., Sanna-Passino G., Demontis S., and Bazzoni E. (2002) Essential Oil Formulations Useful as a New Tool for Insect Pest Control. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 3 (2) article 13, 1-11.
- Muckensturm B., Foechterlen D., Reduron J.-P., Dantont T.P. and Hildenbrand. (1997). Phytochemical and Chemotaxonomic Studies of *Foeniculum vulgare*. *Biochemical Systematics and Ecology.* **25** (4), 353-358.
- Mulla M.S. and Su T. (1999). Activity and biological effects of Neem products against arthropods of medical and veterinary importance. *Journal of the American Mosquito Control Association.* **15**(2): 133-152.
- Muñoz-Bertomeu J., Arrillaga I., Ros R. and Segura J.(2006). Up-Regulation of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Synthase Enhances Production of Essential Oils in Transgenic Spike Lavender. *Plant Physiol.* **142**: 890–900.
- Muñoz-Bertomeu J., Arrillaga I., Segura J. (2007). Essential oil variation within and among natural populations of *Lavandula latifolia* and its relation to their ecological areas. *Biochem. Sys. Ecol.* **35**: 479- 488.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum.* **15**: 473-498.
- Nakajima H., Sonomoto K., Usui, N., Sato F., Yamada Y., Tanaka A. And Fukui S. (1985). Entrapment of *Lavandula vera* cells and production of pigments by entrapped cells. *Journal of Biotechnology.* **2**: 107-117. Referred by: Segura J. and Calvo M.C. (1991). *Lavandula* spp (Lavender): In vitro Culture, regeneratin of Plants, and the Formation of Essencial Oils and Pigments, in: Bajaj Y.P.S. (Edt.), *Biotechnology in agriculture and Forestry, vol. 15, Medicinal and aromatic plants III*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg pp.283-310.
- Nauen R.and Bretschneider T. (2002). New modes of action of insecticides. *Pesticide Outlook.* December, 241-245.

- Nishizawa A., Honda G. and Tabata M. (1989). Determination of final steps in the biosynthesis of essential oil components in *Perilla frutescens*. *Planta. Med.* **55**: 251–252.
- Nitzsche A., Tokalov S.V., Gutzeit H.O. and Ludwig Muller J. (2004) Chemical and biological characterization of cinnamic acid derivatives from cell cultures of lavender (*Lavandula officinalis*) induced by stress and jasmonic acid. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 2915-2923.
- Nugroho B.W., Edrada R.A., Wray V., Witte L., Bringmann G., Gehlinge M., Proksch P. (1999). An insecticidal rocaglamide derivatives and related compounds from *Aglaia odorata* (Meliaceae). *Phytochemistry*. **51**: 367-376.
- Paupardin C. (1976). Sur la différenciation d'un tissu sécréteur et la formation d'huile essentielles des tissus végétaux cultivés *in vitro*. Actes 101e Congr. Soc Savantes, Lille, France, pp. 629-641. Referred by: Hunault H., Desmarest P., Du Manoir J. (1989). *Foeniculum vulgare* Miller: Cell Culture, Regeneration, and the Production of Anethole, *In*: Bajaj YPS (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry 7, Medicinal and Aromatic Plants II*, Berlin Heidelberg, Springer. pp.185-212.
- Paupardin C., Garcia-Rodriguez M.J. & Bricout J. (1980) Multiplication végétative de quelques plantes aromatiques: problèmes posés par la production d'essence. C.R. Acad. Agric. Fr. 66: 658–666. Referred by: Hunault H., Desmarest P., Du Manoir J. (1989). *Foeniculum vulgare* Miller: Cell Culture, Regeneration, and the Production of Anethole, *In*: Bajaj YPS (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry 7, Medicinal and Aromatic Plants II*, Berlin Heidelberg, Springer. pp.185-212.
- Pavlov A.I., Ilieva M.P., Panchev I.N. (2000). Nutrient Medium Optimization for Rosmarinic Acid Production by *Lavandula vera* MM Cell Suspension. *Biotechnol. Prog.* **16** (4): 668-670.
- Pavlov A.I., Georgiev M.I., Panchev I.N. and Ilieva M.P. (2005). Optimization of Rosmarinic Acid Production by *Lavandula vera* MM Plant Cell Suspension in a Laboratory Bioreactor. *Biotechnol. Prog.* **21**: 394-396.
- Perrin B. (2000) Formulation: Improving insecticides through encapsulation. *Pesticide Outlook*, p. 68-71.
- Perrucci S., Macchioni G., Cioni P.C., Flamini G., Morelli I. and Taccini F. (1996) The activity of volatile compounds from *Lavandula angustifolia* against *Psoroptes cuniculi*. *Phytotherapy Research*. **10**(1): 5-8.
- Peppas N. A., Am Ende D. J. (1997). Controlled Release of Perfumes from Polymers. II. Incorporation and Release of Essential Oils from Glassy Polymers. *Journal of Applied Polymer Science*. **66**: 509–513.
- Peterson C. and Coats J. (2001). Insect Repellents-Past, Present and Future. *Pesticide Outlook*. August, 154-158.
- Petropoulos S.A., Daferera D., Akoumianakis C.A., Passam H.C. and Polissiou M.G. (2004). The Effect of Sowing Date and Growth Stage on the Essential Oil Composition of three types of Parsley (*Petroselinum crispum*). *J. Sci. Food Agric.* **84**:1606–1610.
- Piccaglia R. and Marotti M. (2001). Characterization of Some Italian Types of Wild Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) *J. Agric. Food Chem.* **49**: 239-244.

- Pino J. A., Rosado A., Goire I. and Roncal E. (1995). Evaluation of flavor characteristic compounds in dill herb essential oil by sensory analysis and gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **43**: 1307-1309.
- Politi M., De Tommasi N., Pescitelli G., Di Bari L., Morelli I. and Braca A. (2002) Structure and Absolute Configuration of New Diterpenes from *Lavandula multifida*. *J. Nat. Prod.* **65**:1742-1745.
- Prajapati V., Tripathi A.K., Aggarwal K.K. and Khanuja S.P.S. (2005). Insecticidal, Repellent and Oviposition-deterrent Activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Bioresource Technology*. **96**: 1749–1757.
- Proestos C., Sereli D. and Komaitis M. (2006) Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chem.* **95**: 44–52.
- Refaat M., Momen F.M. and Amer S.A.A. (2002). Acaricidal Activity of Sweet Basil and French Lavender Essential Oils Against Two Species of Mites of the Family Tetranychidae (Acari: Tetranychidae). *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*. **37** (1-3): 287-298.
- Regnault-Roger C. (1997). The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integrated Pest Management Reviews*. **2**:25–34.
- Reverchon E. e Della Porta G. J. (1995) Supercritical CO₂ Extraction and Fractionation of Lavender Essential Oil and Waxes. *J. Agric. Food Chem.* **43**: 1654-1658.
- Robinson R.W.(1954) Seed Germination Problems in the Umbelliferae. *The Botanical Review* .vol. XX, Nov. No. 9. 531-550.
- Rocha K. D. (2005). Abordagem aos Métodos de Controlo de Vectores da Malária: Estudos dos Efeitos Biocidas de *Thevetia peruviana* Schum. em *Anopheles atroparvus* van Thiel, 1927 (DIPTERA, CULICIDAE)”. Tese de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 67 p.
- Rocha D.K., Matos O.C. e Grácio A.J.S. (2006). Actividade Larvicida de Óleos Essenciais em *Anopheles atroparvus* van Thiel, 1927 (Diptera, Culicidae). *Acta parasitológica Portuguesa*. **13** (1-2): 15-17.
- Rodrigues A.P.A.C., Laura V.A., Chermouth K.D.S. e Gadum J. (2008). Absorção de Água por sementes de Salsa, em duas Temperaturas. *Revista Brasileira de Sementes*. **30** (1), 49-54.
- Sampaio G. (1988). *Flora Portuguesa*. 3ª Edição. Dirigida por Pires de Lima A. Fac-Simile. Instituto Científico Nacional de investigação. 792p.
- Sangwan N.S., Farooqi A.H.A., Shabih F. and Sangwan R.S. (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*. **34**: 3–21.
- Santos F.A. and Rao V.S.N. (2000). Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytother. Res.* **14**: 240–244.
- Santos P.M., Figueiredo A.C., Lourenço P.M.L., Barroso J.G., Pedro L.G., Oliveira M.M., Schripsema J., Deans S.G. and Scheffer J.C. (2002). Hairy root cultures of *Anethum graveolens* (dill): Establishment, Growth, Time-Course Study of their Essential Oil and its Comparison with Parent Plant Oils. *Biotechnology Letters*. **24**: 1031–1036.

- Santos-Gomes P. C. and Fernandes-Ferreira M. (2001). Organ- and Season- Dependent Variation in the Essential Oil Composition of *Salvia officinalis* L. Cultivated at Two Different Sites. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 2908-2916.
- Sasson Y., Levy-Ruso G., Toledano O. and Ishaaya I. (2007). Nanosuspensions: Emerging Novel Agrochemical Formulations, in: Ishaaya I., Nauen R. and Horowitz A.R. (Eds), *Insecticides Design Using Advanced Technologies*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 1-35.
- Segura J. and Calvo M.C. (1991). *Lavandula* spp (Lavender): In vitro Culture, regeneration of Plants, and the Formation of Essential Oils and Pigments, In: Bajaj, Y.P.S. (Edt.) *Biotechnology in agriculture and Forestry, vol. 15, Medicinal and aromatic plants III*, Springer- Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 283-310.
- Service M.W. (Eds) (1986). *Lecture Notes on Medical Entomology*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London, Edinburgh, Boston, Palo Alto and Melbourne. 135 p.
- Service M. W. (Eds) (1996). Introduction to mosquitoes (Culicidae). *Medical Entomology for Students*. Chapman & Hall. p.1-32.
- Shaaya E. and Rafaeli A. (2007). Essential Oils as Biorational Insecticides–Potency and Mode of Action, in: Ishaaya I., Nauen R and Horowitz AR. (Eds), *Insecticides Design Using Advanced Technologies*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 249-261.
- Shibamoto T. (1987). Retention Indices in Essential Oil Analysis, In: Sandra P. and Bicchi C. (Eds.) *Capillary Gas Chromatography in Essencial Oil Analysis*. Huethig, Heidelberg; Basel; New York. p. 259-274.
- Shimizu, M., Shogawa H., Matsuzawa T., Yonezawa S., Hayashi T., Arisawa M. *et al.* (1990). Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. IV. Constituents and anti-inflammatory effect of Paraguayan crude drug "alhucema" (*Lavandula latifolia* Vill.). *Chem. Pharm. Bull.* **38**: 2283–2284.
- Simon J.E. and Quinn J. (1988). Characterization of Essential Oil of Parsley. *J. Agrlc. Food Chem.* **36**: 467-472.
- Skoula M., Abidi C. and Kokkalou E. (1996) Essential oil variation of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* growing wild in crete (Greece). *Biochem. Sys. Ecol.* **24** (3): 255-260.
- Sousa L.A., Albuquerque J.C.R., Leite M.N., Stefanini M.B. (2005). Sazonalidade dos ductos secretores e óleo essencial de *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* Mill. (Apiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 15(2): 155-161.
- Sousa O.F.R.M. (2006). Produção de Metabolitos Secundários por Culturas *in vivo* e *in vitro* de *Lavandula angustifolia* Miller. Relatório de estágio da Licenciatura de Biologia Aplicada. Departamento de Biologia, escola de ciências, Universidade do Minho, Portugal, 71p.
- Sousa O.F.R.M. e Fernandes-Ferreira M. (2007). Composição dos óleos essenciais de *Lavandula angustifolia* Mill. *in vivo* e *in vitro*: correlação com diferentes fases de maturação dos órgãos. Actas do II Colóquio Nacional de Plantas Aromáticas e Medicinais, pp. 268-274, Associação Portuguesa de Horticultura (Eds), Caldas do Gerês, Portugal.

- Stefanini M.B., Ming L.C., Marques M.O.M., Facanali R., Meireles M.A.A., Moura L.S. Marchese J.A. and Sousa L.A. (2006). Essential oil constituents of different organs of fennel (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*). *Rev. Bras. Pl. Med., Butucatu.* **8**: 193-198.
- Suárez-Cervera M. e Seoane-Camba J. A. (1986). Taxonomía numérica de algunas especies de *lavandula*, basada en caracteres morfológicos, cariológicos y palinológicos. *Anales Jard. Bot. Madrid.* **42**(2): 395-409.
- Sudriá C., Piñol M.T., Palazón J., Cusidó R.M., Vila R., Morales C., Bonfill M. and Cañigüeral S. (1999). Influence of plant growth regulators on the growth and essential oil content of cultured *Lavandula dentata* plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* **58**: 177–184.
- Sugiura M., Machii N., Watanabe H., Tabuchi A. and Karasawa D. (1998). Essential Oil components from hairy roots and transgenic plant of *Foeniculum vulgare* Mill. *Koryo, Terupen oyobi Seiyu Kagaku ni kansuru Toronkai Koen Yoshishu.* 42:7-8.
- Sugiura M., Watanabe H., Tabuchi A. and Karasawa D. (2000). Essential Oil components from hairy roots and transgenic plant of *Foeniculum vulgare* Mill. 2. *Koryo, Terupen oyobi Seiyu Kagaku ni kansuru Toronkai Koen Yoshishu.* **44**:246-248.
- Sudriá C., Palazón J., Cusidó R.M., Bonfill M., Piñol M.T. and Morales C. (2001). Effect of benziladenina and indolebutiric acid on ultraestructural gland formation and essential oil accumulation in *Lavandula dentata* plantlets. *Biologia Plantarum.* **44**(1): 1-6.
- Timmer R., Heide R., Valois P.J. and Wobben H.J. (1975) Analysis of the lactone fraction of lavender oil (*Lavandula vera* D. C.) *J. Agr. Food Chem.* **23** (1): 53-56.
- Thomas T. H. (1996). Relationships between position on the parent plant and germination characteristics of seeds of parsley (*Petroselinum crispum* Nym.) *Plant Growth Regulation.* **18**: 175-181.
- Topçu G., Herrmann G., Kolak U., Gören C. Porzel A. and Kutchan T.(2007). Isolation of fatty acids and aromatics from cell suspension cultures of *Lavandula angustifolia* *Natural Product Research.* **21** (2): 100–105.
- Traboulsi A.F., Taoubi K., El-Haj S., Bessiere J.M. and Rammal S. (2002). Insecticidal properties of essential oils against the mosquito *Culex Pipiens molestus* (Diptera:Culicidae). *Pest Manag. Sci.* **58**:491-495.
- Tsuro M., Koda M., Inoue M. (1999). Comparative effect of different types of cytokinin for shoot formation and plant regeneration in leaf-derived callus of lavender (*Lavandula vera* DC). *Sci. Hort.* **81** (3): 331-336.
- Tsuro M., Koda M., Inoue M. (2000) Efficient plant regeneration from multiple shoots formed in the leaf-derived callus of *Lavandula vera*, using the “open culture system”. *Sci. Hort.* **86** (1):81-88.
- Umezu T., Nagano K., Ito H., Kosakai K., Sakaniwa M. and Morita M. (2006). Anticonflict effects of lavender oil and identification of its active constituents). *Pharmacol. Biochem. and Behav.* **85**: 713–72.

- Valdés B., Talavera S. e Galiano E.F. (1987). *Flora Vascular de Andalucía Occidental*. Vol. I. Ketres Editor, S.A. Barcelona. 485p.
- Vandemoortele J.E, Billard J., Boucaud Gaspar Th. (1996). Micropropagation of parsley through axillary shoot proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **44**: 25-30.
- van Tol R.W.H.M., Swarts H.J., van der Linden A. and Visser J.H. (2007). Repellence of the red bud borer *Resseliella oculiperda* from grafted apple trees by impregnation of rubber budding strips with essential oils. *Pest Manag Sci.* **63** (5):483–490.
- Vasil I.K. and Hildebrandt A.C.(1966). Variations of morphogenetic behaviour in plant tissue cultures II. *Petroselinum hortense*. *Amer. J. Bot.* **53**:869-874.
- Weisshaar B. and Jenkins G.I. (1998). Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Current Opinion in Plant Biology*. **1**:251-257.
- White G.B.(1977). The Place of Morphological Studies in the Investigation of Anopheles Species Complexes. *Mosquito Systematics*. **9**(1), 1-24.
- White G.B. (1978). Systematic reappraisal of the *Anopheles maculipennis* complex. *Mosq. Syst.*, **10**:13-44. Referred by: Jetten T.H. and Takken W. (1994). Anophelism without malaria in Europe, A review of the ecology and distribution of the genus *Anopheles* in Europe. Wageningen Agricultural University Papers. 94.5. 69 p.
- World Health Organization(1968). Méthodes Statistiques Utilizables dans les Campagnes d'éradication du Paludisme. Satra Swaroop. OMS. Genève. pp. 117-129.
- World Health Organization (1996). Report of the WHO Informal Consultation of the "Evaluation and Testing of Insecticides". WHO pesticide evaluation scheme (WHOPES). World Health Organization, Division of Control of Tropical Diseases (CTD). 70 p.
- World Health Organization (2005). Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito larvicides. Communicable Disease Control, Prevention and Eradication. WHO Pesticide evaluation scheme. 39p.
- Yusufoğlu A., Çelik H. and Kirbaşlar F.G.(2004). Utilization of *Lavandula angustifolia* Miller extracts as natural repellents, pharmaceutical and industrial auxiliaries *J.Serb.Chem.Soc.* **69** (1)1–7.

6. Anexos

Tabela A1. Caracterização dos óleos essenciais (com teores absolutos dos constituintes) extraídos de eixos florais de *Lavandula angustifolia* colhidos em Agosto de 2008 a partir de arbustos em plena floração num campo experimental em Lamações (Braga) e de rebentos caulinares cultivados *in vitro* em meio MS com BA (0,5 mg/l) durante dezasseis semanas de cultura.

Compostos	KI calc. ¹	KI ²	Eixos florais	Rebentos caulinares
	GC (DB-5)	Ref.	Teor absoluto (µg/g peso seco)	Teor absoluto (µg/g peso seco)
α-Tujeno	928	931	rd	7 ± 1
α-Pineno	935	939	46 ± 5	132 ± 28
Canfeno	950	953	42 ± 4	43 ± 9
Sabineno	978	975	rd	59 ± 10
β-Pineno	980	980	150 ± 13	144 ± 19
3-Octanona	987	989	rd	52 ± 10
Mirceno	991	990	98 ± 12	79 ± 14
Acetato de hexilo	996	1001	rd	...
α-Felandreno	1004	1002	23 ± 2	13 ± 2
δ-3-Careno	1010	1011	60 ± 6	139 ± 27
α-Terpineno	1014	1017	rd	9 ± 2
o-Cimeno	1023	1022	rd	21 ± 3
p-Cimeno	1028	1026, 1033	252 ± 30	63 ± 11
Limoneno	1031	1024	772 ± 86	463 ± 88
1,8-Cineole	1037	1033	608 ± 72	2600 ± 523
Z-β-Ocimeno	1047	1044	86 ± 10	11 ± 2
E-β-ocimeno	1056	1050	50 ± 5	9 ± 2
γ-Terpineno	1065	1062	24 ± 2	18 ± 4
cis-Hidrato de sabineno	1070	1069	...	21 ± 4
Terpinoleno	1083	1088	85 ± 6	11 ± 2
Terpinoleno	1090	1088	...	22 ± 5
Linalool	1100	1098	19386 ± 2028	...
trans-Tujona	1117	1114	rd	33 ± 5
Terpinen-1-ol *	1121	1130	51 ± 4	21 ± 3
α- Canfolenal	1130	1125,1127	...	11 ± 2
trans-Pinocarveol	1143	1141	...	49 ± 13
Cânfora	1141	1146	3915 ± 426	1699 ± 339
trans-Verbenol *	1144	1148	65 ± 7	8 ± 2
N.l.	1165	6 ± 1
Pinocarvona	1167	1163	...	91 ± 13
Borneol	1164	1165	1797 ± 198	1221 ± 234
Lavandulol	1168	1172	475 ± 42	...
N.l.	1177	38 ± 24
Terpinen-4-ol	1177	1177	2821 ± 320	95 ± 14
p-Cimeno-8-ol	1184	1183	88 ± 9	15 ± 5
α-Terpineol	1188	1189	210 ± 23	140 ± 26
Butirato de hexilo	1193	1193	220 ± 21	...
Mirtenal	1199	1195	...	170 ± 29
Mirtenol	1202	1192	...	88 ± 16
trans-Carveol	1218	1217	20 ± 2	17 ± 7
cis- Carveol	1226	1227	33 ± 3	12 ± 2

Tabela A1. (Continuação)

Compostos	KI calc. ¹	KI ²	Eixos florais	Rebentos caulinares
	GC (DB-5)	Ref.	Teor absoluto (µg/g peso seco)	Teor absoluto (µg/g peso seco)
N.I.	1232	19 ± 3
<i>n</i> -hexil-2-metil-butanoato	1237	1237	39 ± 4	85 ± 26
cuminil aldeído	1240	1238	94 ± 10	42 ± 8
Isovalerato de hexilo	1243	1244	17 ± 2	...
Carvone*	1245	1243	36 ± 4	5 ± 1
Acetato de linalilo	1260	1257	1337 ± 150	...
Geranial	1275	1270	...	25 ± 8
Perilla aldeído	1272	1272	rd	13 ± 6
Acetato de bornilo	1289	1289	rd	16 ± 5
Formato de geranilo	1293	1292	508 ± 59	...
Tiglato de hexilo	1333	1333	44 ± 4	21 ± 4
Acetato de nerilo	1367	1364	33 ± 23	...
β-Bourboneno*	1382	1384	...	47 ± 7
Acetato de geranilo	1385	1382	79 ± 20	6 ± 1
Hexanoato de hexilo	1388	1384	42 ± 33	125 ± 22
β-Elemene	1387	1388,1391	...	8 ± 0
α-Gurjunene	1411	1409	...	39 ± 6
E-Cariofileno	1412	1419	130 ± 13	155 ± 21
N.I.	1416	...	25 ± 2	...
α- <i>trans</i> -Bergamoteno	1433	1435	18 ± 3	...
N.I.	1449	12 ± 2
E-β-farneseno	1455	1454	rd	...
γ-Elemeno*	1456	7 ± 1
Z-β-farneseno	1458	1457	789 ± 86	...
Germacreno D isomer #1 *	1465	24 ± 6
N.I.	1475	...	28 ± 3	...
γ-Gurjuneno	1476	1473	...	6 ± 2
Germacreno D	1480	1480	147 ± 15	88 ± 15
N.I.	1497	14 ± 2
E-E-α-Farneseno	1507	1504	34 ± 3	...
Isobutirato de geranilo	1511	1514	147 ± 14	...
γ-Cadineno	1516	1513	...	289 ± 34
δ-Cadineno	1521	1524, 1530	...	13 ± 0
1R, <i>trans</i> ou <i>cis</i> -Calamene	1525	1517/1532	...	38 ± 4
N.I.	1527	40 ± 4
N.I.	1555	37 ± 10
N.I.	1569	9 ± 2
α-Cadinol isomer #1 *	1577	24 ± 5
Óxido de cariofileno	1584	1583	51 ± 4	325 ± 55
N.I.	1604	22 ± 7
N.I.	1611	14 ± 2
N.I.	1617	49 ± 8
epi-α-Cadinol	1646	1640	...	718 ± 108
α-Cadinol	1657	1653	...	22 ± 4
N.I.	1666	14 ± 3
Z-α-Santalol	1674	1675	...	10 ± 1
epi-α-Bisabolol	1686	1685	...	33 ± 5

Tabela A1. (Continuação)

Compostos	KI calc. ¹	KI ²	Eixos florais	Rebentos caulinares
	GC (DB-5)	Ref.	Teor absoluto (µg/g peso seco)	Teor absoluto (µg/g peso seco)
N.I.	1689	84 ± 20
Z-E-Acetato de farnesilo	1696	1701	rd	...
N.I.	1717	9 ± 0
N.I.	1748	19 ± 3
N.I.	1889	22 ± 3
N.I.	1924	11 ± 1
N.I.	1955	23 ± 6
N.I.	1969	23 ± 17
N.I.	1975	398 ± 79
N.I.	2007	37 ± 11
N.I.	2214	16 ± 3
N.I.	2208	40 ± 12
N.I.	2220	17 ± 1

Agrupamento dos constituintes			
Hydrocarbonetos monoterpénicos	1688	1243	
Monoterpenos oxigenados	29533	6334	
Monoterpenil ésteres	2319	278	
Hydrocarbonetos sesquiterpénicos	1118	673	
Sesquiterpenos oxigenados	51	1132	
Sesquiterpenil ésteres	147	1083	
Quantificação total	34974 ± 3727	10781 ± 1819	

¹ Valores de Índice de Kovats determinados por análise cromatográfica para a amostra de OE de plântulas *in vitro* com co-injecção de uma série de *n*-alcanos numa coluna DB-5 (5% fenil, dimetil polissiloxano como fase estacionária). No caso de compostos presentes unicamente nas outras amostra foram inseridos os respectivos KI.

² Valores de Índice de Kovats encontrados nas biblioteca de compostos e literatura para colunas equivalentes com a mesma fase estacionária que a DB-5. Também se recorreu à consulta de KI no site: www.pherobase.com

rd : Constituintes residuais que, embora identificados, encontram-se presentes em teores relativos inferiores a 0,05% após normalização das áreas e correcção da área total por subtracção dos picos do solvente e padrão interno.

N.I. Constituintes não identificados o por falta de semelhança com os espectros consultados ou propostas pouco plausíveis tendo em conta os KI.

* Proposta de Identificação dúbia e a considerar com reservas devido a esta se basear somente num dos critério de identificação ou devido à ausência de informação acerca dos KI.

... Compostos não detectados na amostra.

Tabela A2. Caracterização dos óleos essenciais (OEs) (com teores absolutos dos constituintes) de infrutescências frescas (frutos e umbelas) e partes vegetativas de *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* colhidas em Outubro de 2008 numa população silvestre crescida em S. Paio de Merelim (Braga) e de plântulas germinadas e cultivadas *in vitro* em meio MS durante doze semanas.

Compostos	KI calc. ¹	KI ²	Infrutescências	Partes vegetativas	Plântulas <i>in vitro</i>
	GC (DB-5)	Ref.	Teor absoluto (µg/g peso seco)	Teor absoluto (µg/g peso seco)	Teor absoluto (µg/g peso seco)
α-Tujeno	929	931	rd	9 ± 1	26 ± 7
α-Pineno	936	939	1005 ± 101	758 ± 95	789 ± 172
Canfeno	951	953	51 ± 6	19 ± 2	rd
Sabineno	975	975	98 ± 8	57 ± 8	34 ± 8
β-Pineno	978	980	381 ± 39	56 ± 7	81 ± 19
Mirceno	991	990	327 ± 33	263 ± 34	255 ± 54
α-Felandreno	1005	1002	1532 ± 155	1485 ± 188	6597 ± 1384
α-Terpineno	1017	1016	rd	9 ± 1	21 ± 10
ortho-Cimeno	1025	1026	40 ± 4	15 ± 2	230 ± 42
β-Felandreno	1030	1030	891 ± 90	890 ± 112	1937 ± 365
1,8- Cineole	1035	1033	220 ± 24
z-β-ocimene	1040	1037	58 ± 6	214 ± 27	253 ± 38
E-β-ocimene	1050	1050	rd	8 ± 1	14 ± 3
γ-terpinene	1060	1062	94 ± 10	31 ± 4	681 ± 129
± Hidrato de Sabineno*	1071	1068	rd
Terpinoleno + 2,5-dimetil estireno	1088	1088/1099	56 ± 13
Fenchona	1090	1087	5134 ± 533	1000 ± 124	...
Linalool	1100	1100	17 ± 2
Undecano	1100	1100	66 ± 13
Isopentenilo de isovalerato	1107	1103, 1105	...	rd	...
Fenchol	1116	1117	rd	rd	...
1,3,8 <i>p</i> -mentatrieno	1122	1114	rd
exo-Fenchol	1121	1122, 1124	rd	rd	...
cis- <i>p</i> -Ment-2-en-1-ol*	1125	1122	rd	rd	...
allo -Ocimeno*	1131	1129	rd	20 ± 3	24 ± 17
Cânfora	1149	1146	80 ± 8	9 ± 2	...
Terpinen-4-ol	1180	1177	26 ± 3	9 ± 1	...
Estragole	1196	1198	15829 ± 1567	7477 ± 962	3188 ± 537
N.I.	1203	40 ± 34
Acetato de fenchilo (endo)	1220	1221	118 ± 21
Acetato de fenchilo (exo)	1234	1232	22 ± 4
N.I.	1252	146 ± 28
trans-Anetole	1284	1287	4176 ± 436	487 ± 65	4322 ± 666
Tridecano	1300	1300	17 ± 4
N.I.	1306	6 ± 1	...
β-Elemene	1395	1394	21 ± 8
Metil eugenol	1404	1401,1409	rd	rd	27 ± 4
E-Cariofileno	1413	1417	...	rd	43 ± 7
E-β-farnesene	1460	1458	11 ± 1

Tabela A2. (Continuação)

Compostos	KI calc. ¹	KI ²	Infrutescências	Partes vegetativas	Plântulas <i>in vitro</i>
	GC (DB-5)	Ref.	Teor absoluto (µg/g peso seco)	Teor absoluto (µg/g peso seco)	Teor absoluto (µg/g peso seco)
γ- Muuruleno ou γ-Gurjuneno*	1478	52 ± 9
Germacreno D	1480	1481	57 ± 12
β-Selinene	1484	1485	23 ± 4
E,E-α-Farnesene	1508	1504	17 ± 0
Miristicina	1521	1523	rd	rd	26 ± 5
δ- Cadineno*	1521	1520	rd	...	258 ± 35
Elemicina	1562	1556	rd
Dill apiole	1621	1625	232 ± 31
Apiole	1679	1687	930 ± 99
2-Metil- octadecino*	1841	43 ± 5
N.I.	1864	11 ± 2
Agrupamento dos constituintes					
Hidrocarbonetos monoterpenícos			4477	3815	10974
Monoterpenos oxigenados			5477	1018	139
Fenilpropanóides			20005	7964	8898
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos			0	0	482
Outros			0	25	202
Quantificação total			29959 ± 3031	12822 ± 1643	20696 ± 3822

¹ Valores de Índice de Kovats determinados por análise cromatográfica para a amostra de OE de plântulas *in vitro* com co-injecção de uma série de *n*-alcanos numa coluna DB-5 (5% fenil, dimetil polissiloxano como fase estacionária). No caso de compostos presentes unicamente nas outras amostra foram inseridos os respectivos KI.

² Valores de Índice de Kovats encontrados nas biblioteca de compostos e literatura para colunas equivalentes com a mesma fase estacionária que a DB-5. Também se recorreu à consulta de KI no site: www.pherobase.com

rd : Constituintes residuais que, embora identificados, encontram-se presentes em teores relativos inferiores a 0,05% após normalização das áreas e correcção da área total por subtracção dos picos do solvente e padrão interno.

N.I. Constituintes não identificados o por falta de semelhança com os espectros consultados ou propostas pouco plausíveis tendo em conta os KI.

* Proposta de Identificação dúbia e a considerar com reservas devido a esta se basear somente num dos critério de identificação ou devido à ausência de informação acerca dos KI.

... Compostos não detectados na amostra.

Tabela A3. Caracterização dos óleos essenciais (com teores absolutos dos constituintes) de *Petroselinum crispum* spp. *neapolitanum* extraído de plantas cultivadas em campo (infrutescências e partes vegetativas) e plântulas germinadas e desenvolvidas in vitro em meio MS durante doze semanas.

Compostos	KI calc. ¹	KI ²	Infrutescências	Partes vegetativas	Partes vegetativas (Vila Real)	Plântulas <i>in vitro</i>
	GC(DB-5)	ref.	Teor absoluto (µg/g peso seco)	Teor absoluto (µg/g peso seco)	Teor absoluto (µg/g peso seco)	Teor absoluto (µg/g peso seco)
α-Tujeno	929	931	16 ± 2	rd	rd	rd
α-Pineno	937	939	1525 ± 192	91 ± 6	100 ± 13	19 ± 3
Canfeno	950	953	13 ± 1	rd	rd	rd
Sabineno	975	975	77 ± 4	3 ± 0	5 ± 1	6 ± 1
β-Pineno	979	980	1480 ± 126	44 ± 3	44 ± 5	18 ± 3
Mirceno	992	990	245 ± 24	342 ± 21	339 ± 37	292 ± 36
α-Felandreno	1005	1002	41 ± 3	33 ± 4	39 ± 4	58 ± 7
δ-3-Careno	1013	1008	rd	rd
α-Terpineno	1017	1018	rd	5 ± 0	rd	rd
<i>ortho</i> -Cimeno	1025	1026	6 ± 1	5 ± 1	10 ± 1	4 ± 2
β- Felandreno	1030	1030	647 ± 66	393 ± 25	357 ± 37	1143 ± 124
z-β-Ocimeno	1040	1037	rd	rd	6 ± 1	rd
E-β-ocimeno	1051	1050	28 ± 3	...
γ-Terpineno	1060	1062	rd	4 ± 0	10 ± 1	8 ± 1
Terpinoleno +1-metil-4-isopropenilbenzeno	1092	1088/1099	185 ± 18	479 ± 19	677 ± 67	41 ± 4
2-metil-2-propenil fenol*	1100	4 ± 1	...
1,3,8 <i>p</i> -mentatrieno	1113	1114	1567 ± 131	1870 ± 504	2440 ± 330	40 ± 4
<i>O</i> -Allilfenol *	1123	2 ± 1
<i>allo</i> -Ocimene*	1132	1129	5 ± 1	...
3-etenil-1,2-dimetil-1,4-ciclohexadieno*	1135	...	9 ± 1	21 ± 5	23 ± 3	...
N.I.	1140	3 ± 0	4 ± 0	...
N.I.	1161	3 ± 1
<i>cis</i> -Carveol	1174	1175	...	2 ± 1
Terpinen-4-ol	1176	1177	7 ± 1	rd
<i>p</i> cymen-8-ol	1186	1183	rd	7 ± 2
3 ou 4-Metilacetofenona	1188	1193	16 ± 1	...
α-Terpineol	1190	1189	4 ± 1	8 ± 0
Dihidrocarveol *	1190	1192	4 ± 0
N.I.	1191	10 ± 0	...
N.I.	1189	3 ± 0
Mirtenal	1193	1193	99 ± 14	2 ± 0
N.I.	1198	3 ± 1
Estragole	1200	1198	10 ± 0	...
N.I.	1203	4 ± 0	5 ± 1	...
<i>n</i> -Decanal	1206	1205	rd
1-Hidroximetil-4-isopropilbenzeno	1222	1225	...	96 ± 51	165 ± 26	...
<i>trans</i> - 3-Caren-2-ol *	1223	1227	12 ± 2
N.I.	1231	7 ± 1	7 ± 0

Tabela A3. (Continuação)

Compostos	KI calc. ¹	KI ²	Infrutescências	Partes vegetativas	Partes vegetativas (Vila Real)	Plântulas <i>in vitro</i>
	GC (DB-5)	ref.	Teor absoluto (µg/g peso seco)	Teor absoluto (µg/g peso seco)	Teor absoluto (µg/g peso seco)	Teor absoluto (µg/g peso seco)
Pulegona*	1236	5 ± 0	...
Acetato de mirtenilo*	1238	1233	rd	3 ± 1	4 ± 0	...
Éster metílico de carvacrol	1245	1240	6 ± 1	4 ± 1	4 ± 0	...
Eucarvona ou 6-Canfenona*	1257	7 ± 4	...
N.I.	1270	4 ± 1	3 ± 1	...
Acetato de Bornilo	1285	1287	8 ± 1
N.I.	1286	24 ± 12	55 ± 7	...
Tridecano	1300	1300	3 ± 0	5 ± 0
N.I.	1311	18 ± 5	35 ± 4	3 ± 0
N.I.	1323	...	13 ± 5	51 ± 9	106 ± 9	...
N.I.	1364	3 ± 1	3 ± 0	3 ± 0
N.I.	1370	6 ± 1	...
α-Copaeno	1376	1371, 1376	rd	3 ± 1	7 ± 1	rd
N.I.	1379	2 ± 1	4 ± 0	...
β- Elemeno	1388	1388	rd	3 ± 0	rd	2 ± 0
β- Cubebeno	1389	1390	...	36 ± 5	5 ± 1	...
β-Elemeno*	1397	1391	...	26 ± 3	11 ± 1	...
2-naphtol, 1,2,3,4a,5,6,7 octahydro-4a-methyl *	1403	60 ± 4	...
Metil eugenol	1410	3 ± 0	...
E-Cariofileno	1413	1417	7 ± 4	13 ± 2	15 ± 1	7 ± 1
β-Gurjuneno	1430	1432	rd	...	rd	...
α-trans-Bergamoteno	1434	1435	5 ± 0
allo- Aromadendreno	1452	1458	...	rd	rd	...
E- β- Farnesene	1458	1458	90 ± 4
γ - Gurjunene	1476	1476	...	21 ± 2	...	2 ± 1
Germacreno D	1475	1481	rd	8 ± 1	34 ± 2	24 ± 1
N.I.	1483	23 ± 1
8S,14- Cedran-diol *	1493	2 ± 1	9 ± 0	...
α-Zingibereno	1493	1495	11 ± 1
γ-Elemeno	1495	1482, 1507	...	2 ± 1
α-Muuroleno	1497	1496	4 ± 1	...
β-bisaboleno	1506	1509	51 ± 5
Miristicina	1519	1523	8 ± 2	32 ± 5	156 ± 5	11 ± 2
N.I.	1521
β- Sesquifelandreno	1523	1523	684 ± 19
8S,14- Cedran-diol *	1550	11 ± 2	16 ± 0	12 ± 0
Elemicina	1559	1556	49 ± 3	rd	6 ± 0
Carotol	1596	1600	rd	4 ± 1	3 ± 0	10 ± 1

Tabela A3. (Continuação)

Compostos	KI calc. ¹	KI ²	Infrutescências	Partes vegetativas	Partes vegetativas (Vila Real)	Plântulas <i>in vitro</i>
	GC (DB-5)	ref.	Teor absoluto (µg/g peso seco)	Teor absoluto (µg/g peso seco)	Teor absoluto (µg/g peso seco)	Teor absoluto (µg/g peso seco)
1-Alil-2,3,4,5-tetrametoxibenzeno	1609	...	4081 ± 320	...	5 ± 0	8 ± 1
Dillapiole	1629	1625	4 ± 0	3 ± 0
epi-α-Cadinol	1637	1640	rd	3 ± 1
Apiole	1690	1687	1633 ± 122	96 ± 19	453 ± 11	1472 ± 41
Benzoato de benzilo	1757	1765	...	rd	4 ± 0	2 ± 1
N.I.	1840	15 ± 2
N.I.	1980	6 ± 1	...
Agrupamento dos constituintes						
Hidrocarbonetos monoterpénicos			5802	3269	4055	1630
Monoterpenos oxigenados			122	22	16	17
Sesquiterpenos			20	115	76	874
Fenilpropanóides			5728	228	859	1499
Outros			43	167	330	86
Quantificação total			11741 ± 1071	3804 ± 528	5336 ± 481	4106 ± 285

¹ Valores de Índice de Kovats determinados por análise cromatográfica para a amostra de OE de infrutescências com co-injecção de uma série de *n*-alcanos numa coluna DB-5 (5% fenil, dimetil polissiloxano como fase estacionária). No caso de compostos presentes unicamente nas outras amostra foram inseridos os respectivos KI.

² Valores de Índice de Kovats encontrados nas biblioteca de compostos e literatura para colunas equivalentes com a mesma fase estacionária que a DB-5. Também se recorreu à consulta de KI no site: www.pherobase.com

rd : Constituintes residuais que, embora identificados, encontram-se presentes em teores relativos inferiores a 0,05% após normalização das áreas e correcção da área total por subtracção dos picos do solvente e padrão interno.

N.I. Constituintes não identificados o por falta de semelhança com os espectros consultados ou propostas pouco plausíveis tendo em conta os KI.

* Proposta de identificação dúbia e a considerar com reservas devido a esta se basear somente num dos critério de identificação ou devido à ausência de informação acerca dos KI.

... Compostos não detectados na amostra.

Tabela A4. Caracterização (teores absolutos dos constituintes) do óleo essencial (OE) de caules e folhas jovens de plantas de *Anethum graveolens* cultivadas *in vivo* pela Empresa Ervas Finas (Vila Real) e do respectivo OE extraído de plântulas obtidas por germinação *in vitro* e desenvolvidas em meio MS durante doze semanas.

Compostos	KI calc. ¹	KI ²	Partes vegetativas	Plântulas <i>in vitro</i>
	GC (DB-5)	Ref.	Teor absoluto (µg/g peso seco)	Teor absoluto (µg/g peso seco)
Nonano	900	900	...	20 ± 4
α-Tujeno	929	931	16 ± 2	20 ± 4
α-Pineno	936	939	91 ± 9	109 ± 22
Canfeno	953	953	rd	rd
Sabineno	976	975	7 ± 1	9 ± 2
β-Pineno	980	980	4 ± 0	7 ± 1
Mirceno	992	990	34 ± 3	51 ± 9
α-Felandreno	1008	1002	3785 ± 182	4044 ± 730
α-Terpineno	1019	1018	14 ± 2	12 ± 5
<i>para</i> -Cimeno	1027	1028	21 ± 2	210 ± 36
β-Felandreno	1033	1030	629 ± 53	747 ± 124
z-β-Ocimeno	1039	1037	rd	8 ± 1
E-β-Ocimeno	1050	1050	4 ± 0	rd
γ-Terpineno	1061	1062	rd	rd
Terpinoleno + 2,5-Dimetil estireno	1090	1088/1099	8 ± 1	12 ± 2
Undecano	1100	1100	...	154 ± 21
<i>n</i> -Nonanal	1106	1105	rd	...
1,3,8- <i>p</i> -Mentatrieno	1114	1114	rd	...
<i>p</i> -Ment-2-en-1-ol	1125	1122	rd	rd
3,4-Dimetilo-2,4,6-octatrieno*	1131	rd
Alocimeno*	1133	1129	rd	...
Pentilo de benzeno	1161	1158	...	rd
N.I.	1179	10 ± 1
N.I.	1185	9 ± 1
Dill éter	1194	...	823 ± 60	...
<i>cis</i> -Piperitol	1199	1193	3 ± 1	...
Estragol	1200	1198	rd	...
Dodecano + <i>cis</i> -Anetole	1201	1200/1209	...	rd
<i>trans</i> -Piperitol	1210	1206	rd	rd
Éter metílico de Timol	1238	1241	...	rd
Éter metílico de Carvacrol	1247	1245	...	rd
Piperitone	1259	1255,1258	rd	...
Z-Citral (neral)	1276	1270	rd	...
(-) Acetato de Bornilo	1289	1287,1290	rd	26 ± 2
Tridecano	1300	1300	...	rd
<i>cis</i> - Acetato de carvilo	1366	1362	...	rd
α- Copaeno	1378	1376	rd	...
β- Elemeno	1392	1391,1393	...	rd
N.I.	1419	9 ± 0

Tabela A4. (Continuação)

Compostos	KI calc. ¹	KI ²	Partes vegetativas	Plântulas <i>in vitro</i>
	GC (DB-5)	Ref.	Teor absoluto (µg/g peso seco)	Teor absoluto (µg/g peso seco)
Metil eugenol	1410	1409	rd	...
β- Gurjuneno	1431	1426,1432	rd	rd
Germacreno D	1483	1481	7 ± 1	26 ± 1
Miristicina	1527	1523	16 ± 1	4581 ± 195
Elemicina	1561	1556	...	8 ± 0
Hexadecano	1600	1600	...	rd
Dillapiole	1632	1625	...	1337 ± 80
Δ- Cadinol	1645	1636	rd	...
α- ou β-Eudesmol	1656	1654 ou 1657	...	8 ± 1
α- ou γ- Cadinol	1658	1653	5 ± 1	...
Apiole	1689	1687	...	1401 ± 98
N.I.	1780	...	26 ± 3	...
N.I.	1812	...	6 ± 1	...
3- ou 9-Octadecino	1841	...	11 ± 2	...
N.I.	1958	8 ± 2
N.I.	1962	18 ± 8
N.I.	1969	...	5 ± 1	...
Falcarinol	2037	122 ± 14
N.I.	2635	...	12 ± 0	...
N.I.	2696	...	5 ± 0	...
N.I.	3090	...	21 ± 1	...
Agrupamento dos constituintes				
Hidrocarbonetos monoterpénicos			4613	5229
Monoterpenos oxigenados			826	...
Sesquiterpenos totais			13	34
Fenilpropanóides			16	7449
Outros			86	234
Quantificação total			5559 ± 303	12966 ± 932

¹ Valores de Índice de Kovats determinados por análise cromatográfica para a amostra de OE de plântulas *in vitro* com co-injecção de uma série de *n*-alcanos numa coluna DB-5 (5% fenil, dimetil polissiloxano como fase estacionária). No caso de compostos presentes unicamente nas outras amostra foram inseridos os respectivos KI.

² Valores de Índice de Kovats encontrados nas biblioteca de compostos e literatura para colunas equivalentes com a mesma fase estacionária que a DB-5. Também se recorreu à consulta de KI no site: www.pherobase.com

rd : Constituintes residuais que, embora identificados, encontram-se presentes em teores relativos inferiores a 0,05% após normalização das áreas e correcção da área total por subtracção dos picos do solvente e padrão interno.

N.I. Constituintes não identificados o por falta de semelhança com os espectros consultados ou propostas pouco plausíveis tendo em conta os KI.

* Proposta de Identificação dúbia e a considerar com reservas devido a esta se basear somente num dos critério de identificação ou devido à ausência de informação acerca dos KI.

... Compostos não detectados na amostra.

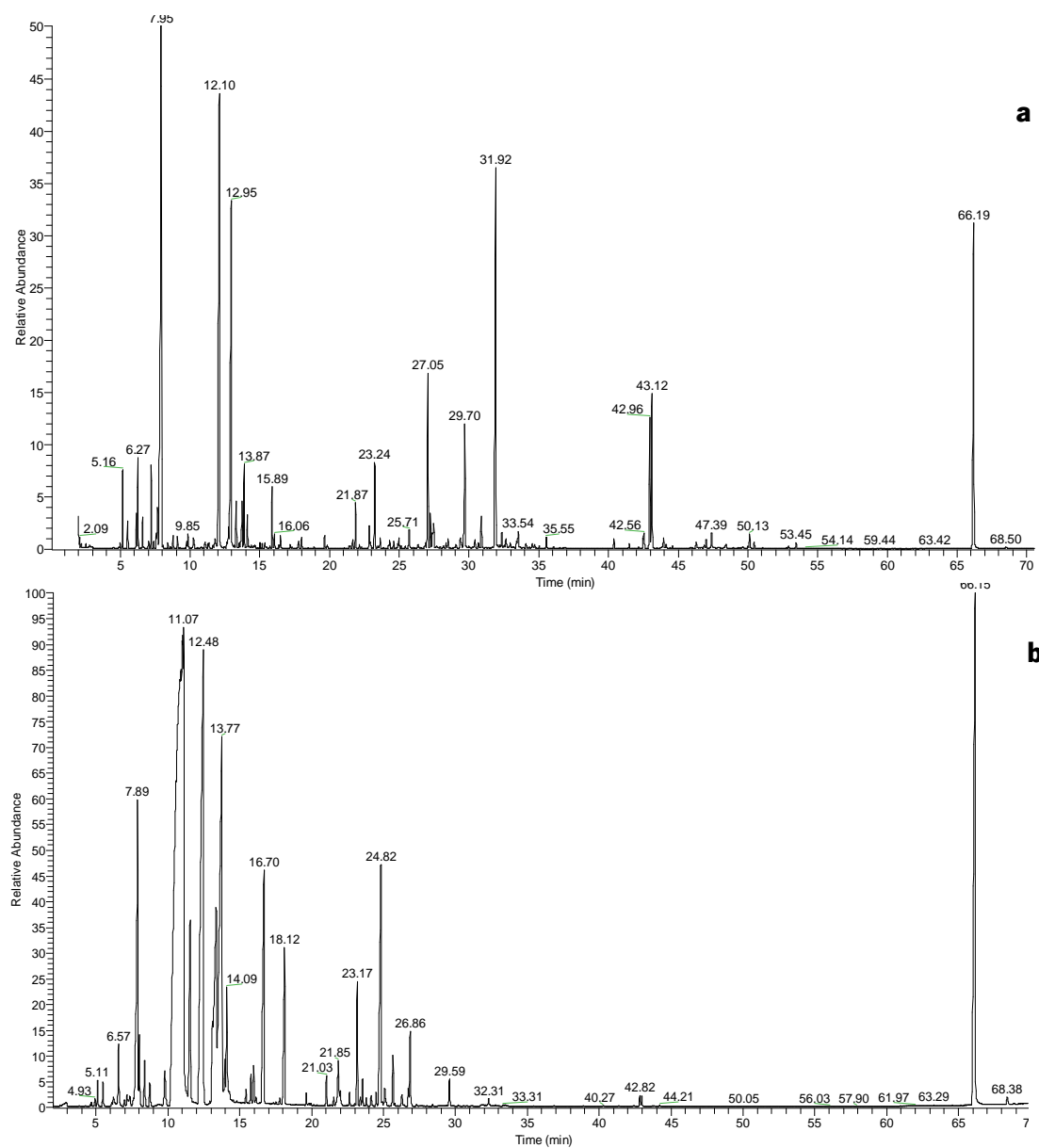


Figura A1. Cromatogramas obtido por análise GC-MS de óleos essenciais (OEs) provenientes de *L. angustifolia*. a) OE obtido por hidrodestilação de eixos florais frescos de alfazema cultivada *in vivo* e colhidos em pleno período de floração 11/08/08. b) OE isolado de culturas *in vitro* de rebentos caulinares micropropagados e cultivados ao longo de dezasseis semanas em meio MS suplementado com BA (0,5 mg/l).

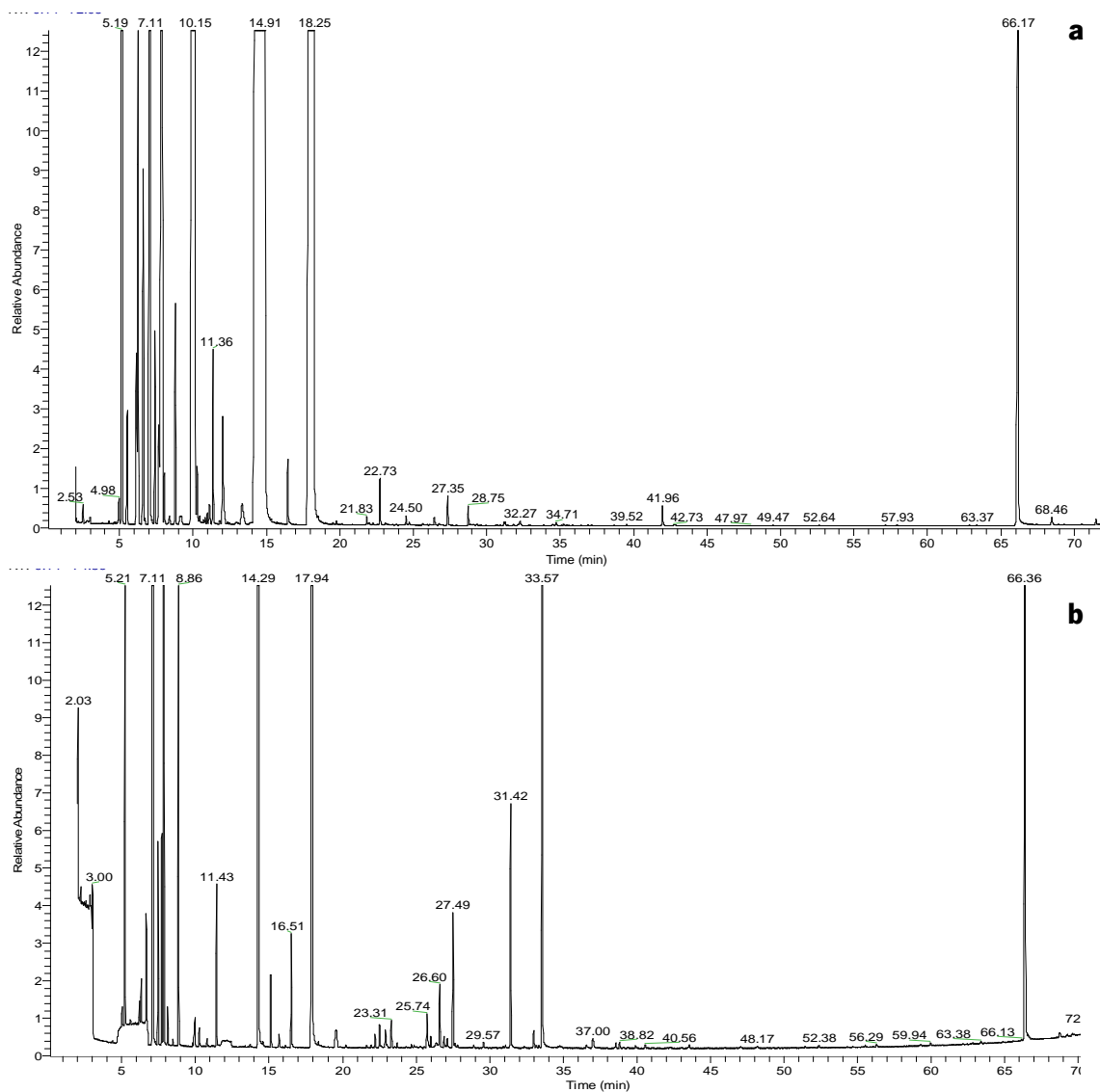


Figura A2. Cromatogramas obtido por análise GC-MS de óleos essenciais (OEs) provenientes de *F. vulgare* var. *vulgare*. a) OE obtido por hidrodestilação de umbelas frescas com infrutescências maduras colhidas em Outubro 2008 a partir de uma população espontânea de funcho silvestre. b) OE isolado de plântulas inteiras de funcho cultivadas *in vitro* ao longo de doze semanas em meio MS após a germinação (sementes proveniente da mesma população silvestre que o material *in vivo*).

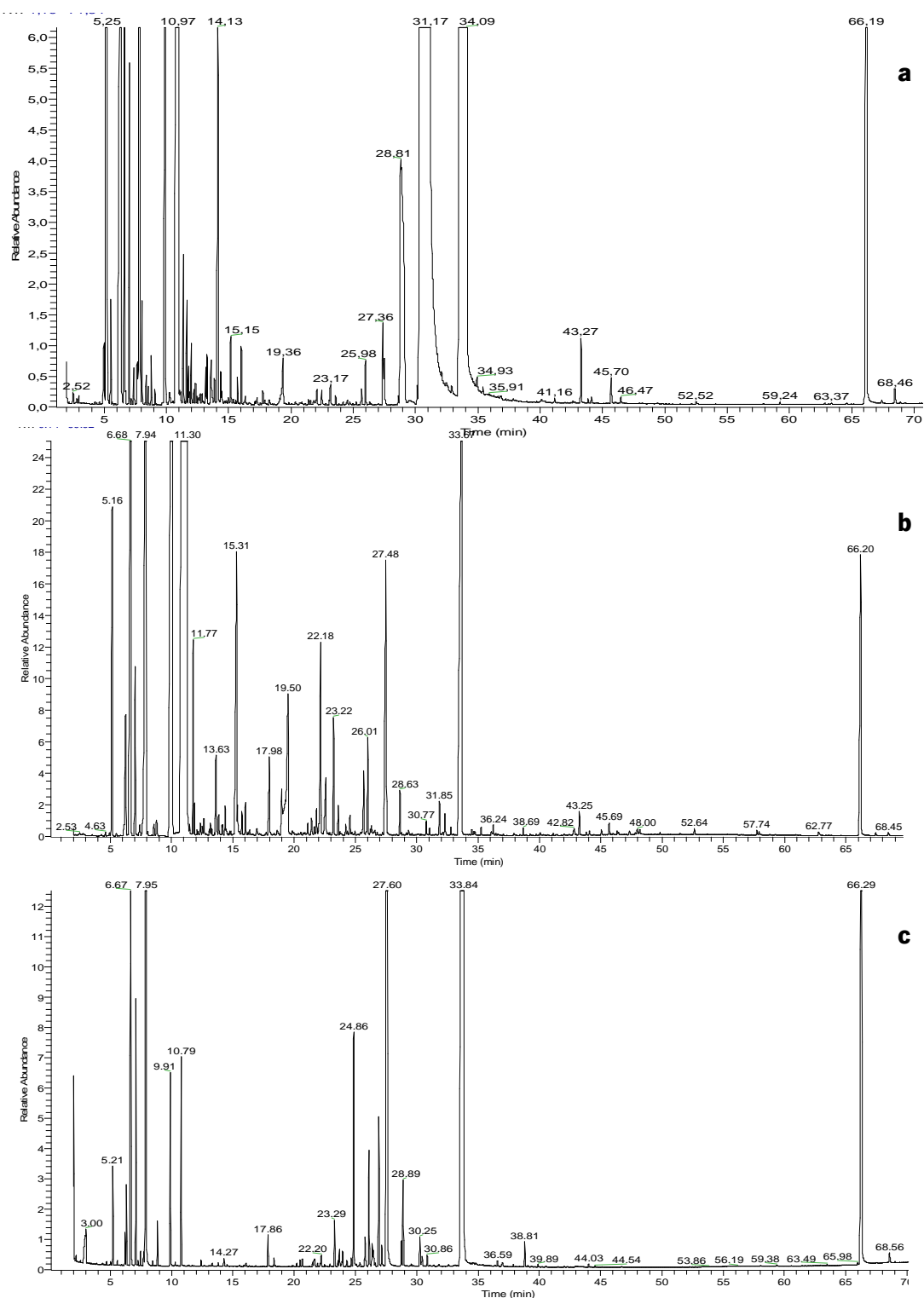


Figura A3. Cromatogramas obtido por análise GC-MS de amostras de óleos essenciais (OEs) de *P. crispum* var *neapolitanum*. a) OE de infrutescências frescas de Salsa caseira hidrodestilada a 26 Agosto 2008. b) OE das partes vegetativas de Salsa caseira hidrodestiladas a 11 de Março 2009. c) OE de plantas de salsa germinadas e cultivadas *in vitro* em meio MS sólido durante doze semanas.

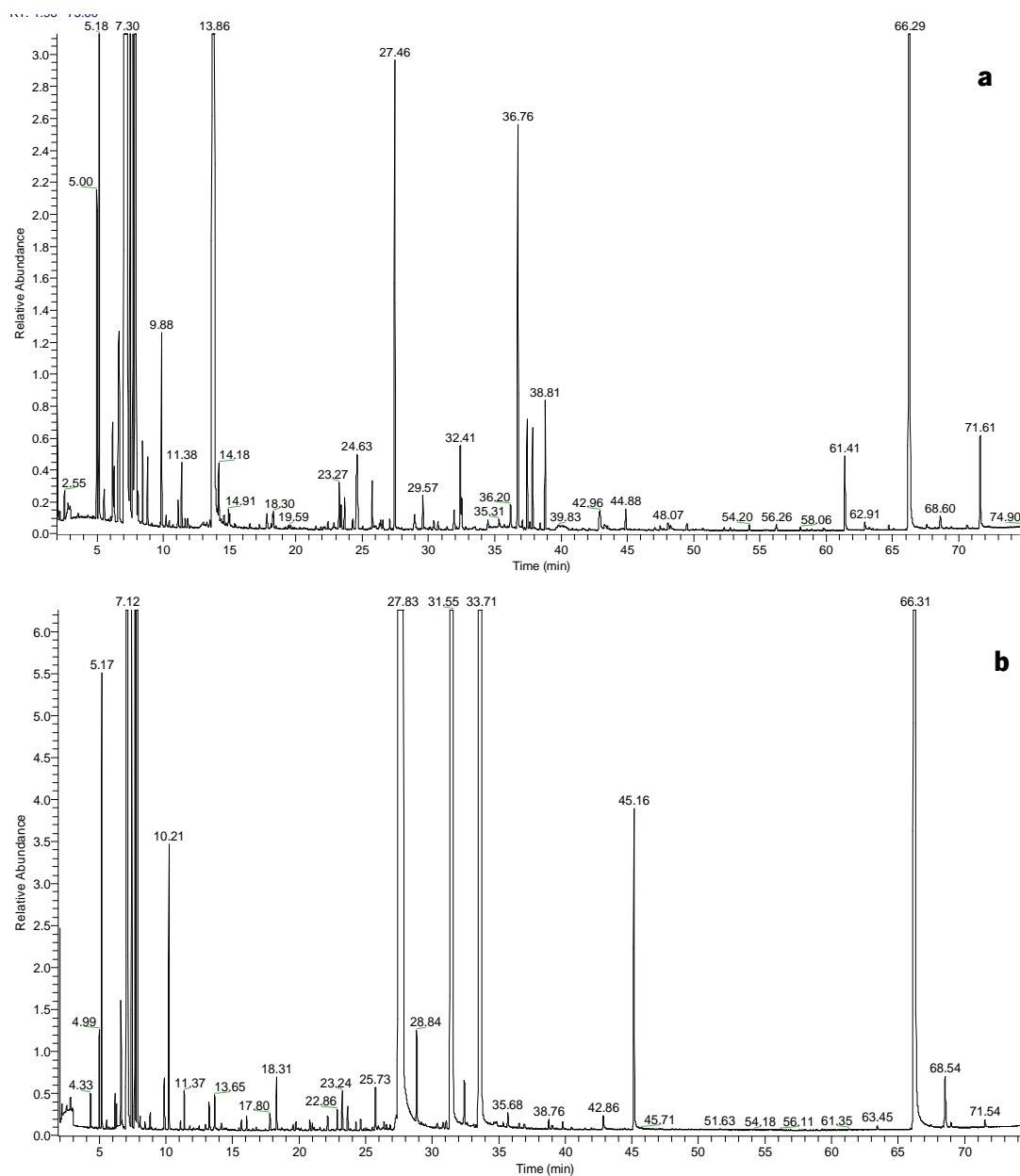


Figura A4. Cromatogramas obtidos por análise em GC-MS de amostras de óleos essenciais de *Anethum graveolens*. a) OE de ramificações (folhas e caules) de jovens plantas de aneto cultivadas *in vivo* em sistema de agricultura biológica pela empresa “Ervas Finas” localizada em Vila Real. b) OE de plântulas de aneto germinadas *in vitro* em meio 1/2MS e desenvolvidas em meio MS completo com 2% de sacarose ao longo de dez semanas após a germinação (semente comerciais).